

# Einfluß der Substrate Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und L-Arginin der Stickstoffmonoxid(NO)-Synthase auf die endogene NO-Bildung und die Atemluftkonzentration von NO

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von      Nadine H e r z o g  
aus                      Kassel

Gießen 2000

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde  
Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie  
Leiter: Prof. Dr. L. Gortner  
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. P.G. Kühl  
Gutachter: Prof. Dr. K.L. Schmidt

Tag der Disputation: 6. Februar 2001

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
1.1 Physiologische Grundlagen	3
1.2 Die Wirkungen von NO	5
1.3 Die Messung von NO	8
1.3.1 Elektrochemische Methode	9
1.3.2 Photoakustische Spektroskopie	9
1.3.3 Chemilumineszenz	10
1.4 Zielsetzung der Untersuchung	12
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1 Probanden	13
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien	14
2.3 Meßtechnik	16
2.4 Meßaufbau	18
2.5 Meßmethoden	20
2.5.1 Untersuchung zum Meßgasvolumenstrom	20
2.5.2 Nasenmessungen	21
2.5.3 Vergleichsmessungen zwischen Reservoir und Atemluftkurve	22
2.5.4 Messungen zur Stabilität von eNO	23
2.5.5 Einfluß der Umgebungsluft auf eNO	24
2.5.6 Einfluß von O <sub>2</sub> auf die NO-Produktion	24
2.5.7 NO-Messung unter Arginin-Belastung	26
2.5.8 NO-Messungen an intubierten Probanden	27
2.6 Studienprotokoll	28
2.7 Statistik	29
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
3.1 Probandengruppen	30
3.2 Gruppe 1: Meßgasvolumenstromuntersuchung	33
3.3 Ergebnisse der Nasenmessungen	34
3.4 Ergebnisse der Vergleichsmessungen von eNO-Reservoir und eNO-Atemluftkurve	35
3.5 Ergebnisse der Messungen zur Stabilität von NO	36
3.5.1 Ergebnisse der Messungen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen	36

3.5.2 Ergebnisse der fünf aufeinanderfolgenden Messungen an einem Tag	38
<b>3.6 Ergebnisse der Messungen zum Einfluß der Umgebungsluft auf eNO</b>	<b>40</b>
<b>3.7 Ergebnisse der Messungen zum Einfluß von Sauerstoff</b>	<b>42</b>
3.7.1 Ergebnisse der Messungen an Gruppe 6	42
3.7.2 Ergebnisse der Messungen an Gruppe 7	44
3.7.3 Ergebnisse der Messungen bei Breathholding	44
<b>3.8 Ergebnisse der Argininbelastungsmessungen</b>	<b>46</b>
<b>3.9 Ergebnisse der Messungen an intubierten Probanden</b>	<b>47</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Diskussion der Meßtechnik und des Meßaufbaus</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Einflußfaktoren der NO-Messung</b>	<b>51</b>
4.2.1 Körperliche Anstrengung	51
4.2.2 Krankheiten als Einflußfaktoren	52
4.2.3 Weitere Einflußfaktoren	52
<b>4.3 Diskussion der unterschiedlichen Meßmethoden</b>	<b>53</b>
<b>5. SCHLUßFOLGERUNGEN</b>	<b>59</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>60</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>62</b>
<b>8. ANHANG</b>	<b>72</b>
<b>8.1 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>8.2 Lebenslauf</b>	<b>73</b>
<b>8.3 Danksagung</b>	<b>74</b>

# 1. Einleitung

NO ist ein ubiquitär vorkommendes Gas, das in verschiedenen Zellarten als intra- und interzellulärer Mediator agiert. In den letzten Jahren ist die Forschung zum NO und seinen Wirkungen im Körper weit vorangeschritten. Es konnte gezeigt werden, daß NO in der Atemluft meßbar ist (Borland et al. 1993). Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Hypothese, daß die Substrate der NO-Synthase die endogene NO-Bildung beeinflussen und daß dieser Einfluß quantitativ in der NO-Atemluftkonzentration messbar ist.

## 1.1 Physiologische Grundlagen

Die Bedeutung von Endothelzellen für die Regulation des Gefäßtonus wurde 1980 von Furchgott und Zawatzki näher untersucht. Sie zeigten, daß die Relaxation von isolierten Arterien durch Acetylcholin von intaktem Gefäßendothel abhängig ist. Acetylcholin mußte folglich eine Substanz in den Endothelzellen stimulieren, die dann eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulzellen verursacht (Furchgott & Zawatzki 1980). Dieser Mediator wurde von Furchgott „endothelium derived relaxant factor“ (EDRF) genannt. Im Jahre 1987 wurde durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen nachgewiesen, daß es sich bei EDRF nicht um ein komplexes Peptid, sondern um das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Palmer et al. 1987). Der vasodilatative Effekt, der von EDRF ausgeht, kann komplett durch das von Endothelzellen freigesetzte NO erklärt werden, die Stoffe sind identisch (Kelm et al. 1988). 1988 zeigten Palmer et al., daß NO aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff gebildet wird (Palmer et al. 1988b). Neben NO entsteht noch Citrullin bei dieser Reaktion. Palmer und Moncada zeigten im Jahre 1989, daß an der Bildung von NO aus L-Arginin ein NADPH-abhängiges Enzym, das in den Endothelzellen der Gefäße vorkommt, beteiligt ist (Palmer & Moncada 1989). Von dem Enzym konnten später mehrere Isoformen identifiziert werden. Man unterscheidet eine konstitutive Form der NO-Synthase (cNOS) von einer induzierbaren Form (iNOS). Die konstitutive Form der NOS ist Calcium-Calmodulin-abhängig und kommt in Neuronen und in Gefäßendothelzellen vor. Die NO-Bildung kann hierbei sehr schnell aktiviert werden, weil das Enzym bereits vorliegt. Die Synthesekapazität ist geringer als bei iNOS, die Bildung erfolgt kontinuierlich. Die induzierbare NOS ist Calcium-unabhängig, sie kommt in Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen vor. Vor der NO-Bildung muß bei der iNOS noch deren Bildung

aktiviert werden, so daß die NO-Freisetzung verzögert einsetzt. Nach Stimulation können jedoch wesentlich größere NO-Mengen gebildet werden als durch die konstitutive NOS (Förstermann et al. 1991; Bredt et al. 1990). Insgesamt werden also drei Typen der NO-Synthase unterschieden:

- Typ 1: neuronale konstitutive NOS (cNOS, z.B. in Neuronen)
- Typ 2: induzierbare NOS (iNOS, z.B. in Macrophagen)
- Typ 3: endotheliale konstitutive NOS (ecNOS, z.B. in Gefäßendothel)

Die Freisetzung von NO wird schließlich durch verschiedene Stimuli angeregt, z.B. Acetylcholin, Bradykinin, Scherkräfte, Hypoxie. Diese Stimuli führen z.B. am Gefäßendothel zur Aktivierung von cNOS, es kommt zur Bildung und Freisetzung von NO. An der Effektorzelle, z.B. an der Gefäßmuskulatur, wirkt NO dann als Mediator und aktiviert die lösliche Guanylatzyklase. Diese führt zur Bildung von cGMP. Der intrazelluläre Anstieg von cGMP führt schließlich zur Relaxation der Gefäßmuskulatur und damit zur Gefäßdilatation (Änggard et al. 1994, Abbildung 1).

Die NOS kann durch verschiedene Stoffe gehemmt werden. Zu den bekanntesten Inhibitoren zählen L-N<sup>G</sup>-Monomethyl-Arginin (L-NMMA) und L-N<sup>G</sup>-Arginin-Methylester (L-NAME). An anästhesierten Kaninchen konnten Rees et al. eine Blutdruckerhöhung nach Gabe von L-NMMA verzeichnen (Rees et al. 1989). Durch die orale Gabe von L-NMMA und L-NAME konnte in Ratten eine Blutdruckerhöhung induziert werden, wobei dieser Effekt reversibel war (Gardiner et al. 1990). Nathan und Lampert fanden schließlich unabhängig voneinander heraus, daß die konstitutive Form der NOS empfindlicher für L-NAME und die induzierbare NOS empfindlicher für L-NMMA zu sein scheint (Nathan et al. 1992; Lampert et al. 1991). An Endothelzellkulturen von Schweinen konnte gezeigt werden, daß auch L-Arginin in unphysiologisch hohen Dosen zu einer reversiblen Hemmung der NOS führt (Su et al. 1997).

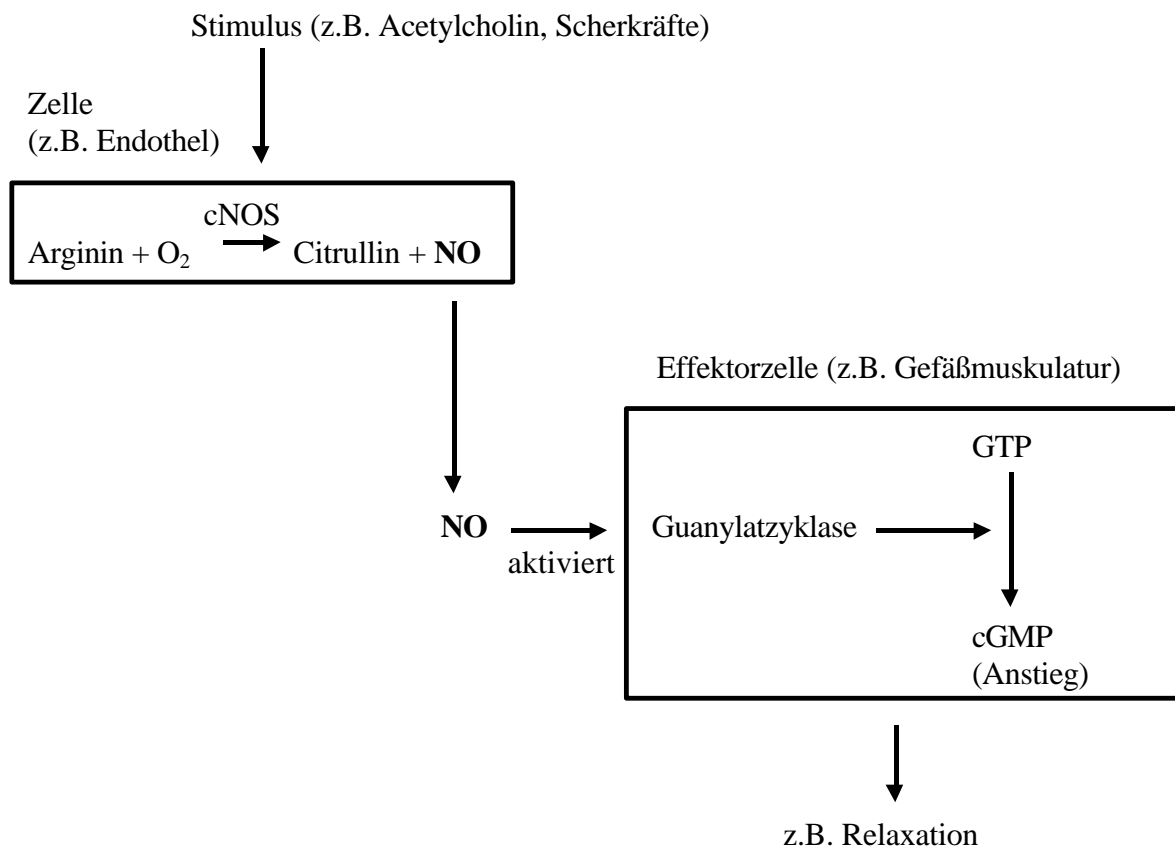


Abbildung 1: Endogene NO-Bildung und Wirkung

## 1.2 Die Wirkungen von NO

NO wird vom Gefäßendothel kontinuierlich freigesetzt und ist damit im kardiovaskulären System für die Regulation des Blutflusses und des Gefäßwiderstandes verantwortlich. Dieser Mechanismus ist wichtig für die Blutdruckregulation. NO wird auch als endogener Vasodilatator beschrieben, weil es bei reduziertem NO-Gehalt zum Blutdruckanstieg kommt (Moncada et al. 1989). Es konnte gezeigt werden, daß es nach Gabe von NOS-Inhibitoren zu einem Blutdruckanstieg kommt, was ein weiteres Indiz für die Wirkung von NO an den Gefäßen ist (Calver et al. 1993). Am Tiermodell fand man, daß bei arterieller Hypertonie die endothelabhängige Relaxation gestört ist (Lockette et al. 1986; Luscher et al. 1987). Panza et al. zeigten 1990 an Patienten mit essentiellen Hypertonus, daß bei ihnen die von intaktem Endothel abhängige Relaxation der Gefäße vermindert ist (Panza et al. 1990). In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, daß die Gabe des NO-Substrats L-Arginin der Entwicklung eines essentiellen Hypertonus entgegenwirkt (Chen et al. 1991). Neben der

Regulation des Gefäßtonus scheint NO auch die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen zu beeinflussen. Durch die Erhöhung von cGMP kann NO die Proliferation der Gefäßmuskulatur dämpfen (Garg & Hassid et al. 1989).

Crawley et al. konnten 1990 beobachten, daß die Relaxation in den Lungengefäßen von intaktem Endothel abhängig ist (Crawley et al. 1990). Eine hypoxische pulmonale Vasokonstriktion scheint mit erniedrigten NO-Konzentrationen einherzugehen. Der pulmonale Blutfluß wird dabei in die gut ventilierten Areale umgeleitet, um die Oxygenierung während der Lungenpassage zu maximieren (Sprague et al. 1992). Bei Patienten mit pulmonaler Hypertension, wie sie z.B. beim neonatalen Atemnotsyndrom und beim ARDS (Acute respiratory distress syndrome) auftritt, konnte die Hypertension durch NO-Inhalation reduziert werden (Abman et al. 1998). Bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen fällt auf, daß die Gefäßrelaxation herabgesetzt ist, auch hier scheint eine verminderte NO-Synthese vorzuliegen (Dinh-Xuan et al. 1991). Im Jahre 1993 fanden Jorens et al. heraus, daß NO nicht nur die Vasorelaxation vermittelt, sondern auch ein Mediator für die Bronchodilatation zu sein scheint (Jorens et al. 1993).

Viele Erkrankungen der Lunge gehen mit veränderter NO-Bildung einher. In einigen Studien konnten Veränderungen in der NO-Bildung bei Patienten mit Asthma bronchiale und bei Patienten mit Cystischer Fibrose nachgewiesen werden. Bei Patienten mit Asthma finden sich erhöhte Werte des expiratorischen NO (eNO) im Vergleich zu gesunden Probanden (Persson et al. 1994; Kharitonov et al. 1994a; Dötsch et al. 1996). Diese gesteigerte NO-Bildung wird vermutlich durch eine gesteigerte Expression der iNOS hervorgerufen (Hamid et al. 1993). Bei Patienten mit Cystischer Fibrose finden sich verminderte NO-Werte, die möglicherweise durch die Zerstörung der NO bildenden Epithelzellen erklärt werden können (Dötsch et al. 1996).

Aufgrund der eben geschilderten Gefäßwirkung von NO scheint NO an der Impotenzentwicklung beteiligt zu sein. Es wurde gefunden, daß NO ein physiologischer Mediator der penilen Erektion ist (Burnett et al. 1992). Viagra®, ein Medikament der erektilen Dysfunktion, steigert den physiologischen Effekt von NO. Bei sexueller Erregung kommt es zur Blockierung der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase Typ 5, die für die cGMP-Verminderung verantwortlich ist. Dadurch wird der cGMP-Gehalt in den Corpora cavernosa erhöht, was zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und damit zur penilen Erektion führt (Pfizer Labs, 1998).



Bei akuten Entzündungen konnte eine Erhöhung von NO in der Atemluft von Probanden nachgewiesen werden (Ialenti et al. 1992). Durch eine Behandlung mit NOS-Inhibitoren konnte ein Rückgang der Entzündung erreicht werden. Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, daß NO an der Entstehung von Entzündungen beteiligt ist. Zellen der körpereigenen Abwehr, wie z.B. Makrophagen, können NO bilden. Stimuliert wird die NO-Bildung dabei von Endotoxinen und Zytokinen (z.B. TNF). In anderen Studien wurde gefunden, daß es beim Endotoxinschock zu einer massiven NO-Freisetzung kommt, die dann zur Vasodilatation führt. Durch die Gabe von NOS-Inhibitoren konnten eine Wiederherstellung des Blutdrucks und eine Gefäßkonstriktion erreicht werden (Wright et al. 1992). Es ist bekannt, daß NO nicht nur ein notwendiger Mediator des Stoffwechsels ist, sondern daß NO in hoher Konzentration zytotoxische Eigenschaften besitzt. Das zytotoxische Potential findet sich in der induzierbaren Form der NOS, die große Mengen von NO bilden kann. Es wird angenommen, daß dieser Vorgang eine Rolle in der körperlichen Antwort auf Infektionen spielt (Hibbs et al. 1988). NO ist dazu in der Lage, an die eisenhaltigen Anteile von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels und der DNA-Synthese der Zielzellen zu binden (Moncada et al. 1993). Dieser Mechanismus in Makrophagen dient der Verteidigung gegen Tumorzellen und gegen Mikroorganismen (Nathan et al. 1991).

Bei der Regulierung der Plättchenaggregation im Blut ist NO von Bedeutung. Bei Gabe von NOS-Inhibitoren kommt es hier zu einer Unterbindung dieser NO-Wirkung und damit zur vermehrten Aggregation der Plättchen (Vallance et al. 1989; Radomski et al. 1987).

Raucher weisen niedrigere eNO-Werte auf als Nichtraucher. Möglicherweise kommt es durch den NO-haltigen Zigarettenrauch zur Hemmung der NOS und damit zur Verminderung von eNO (Kharitonov et al. 1995d). Ein weiterer Grund für verminderte eNO-Werte bei Rauchern könnte in der Zerstörung der NO-bildenden Epithelzellen liegen (Persson et al. 1994).

Der Wirkungsbereich von NO im Körper ist sehr groß. Im zentralen Nervensystem scheint NO als Mediator zu wirken. Es wird vermutet, daß NO dort unter anderem eine Rolle bei der Gedächtnisleistung spielt (Bohme et al. 1991; Schuman et al. 1991). Auch im peripheren Nervensystem des Magen-Darm-Traktes, im Plexus myentericus, findet sich NOS. Die NO-Freisetzung dieser Nerven ist für die Dilatation und Peristaltik des Darms verantwortlich (Desai et al. 1991). NO wird außerdem intragastrisch produziert, denn in aufgestoßener Luft können hohe NO-Werte gemessen werden (Lundberg et al. 1994b). Selbst im Pankreas scheint NO als Mediator vorzukommen. Es ist bekannt, daß L-Arginin bei Anwesenheit von Glukose

eine Insulinfreisetzung aus dem Pankreas hervorrufen kann. In den  $\beta$ -Zellen des Pankreas konnte cNOS gefunden werden (Schmidt et al. 1992), so daß NO möglicherweise unter physiologischen Bedingungen in die Insulinfreisetzung eingebunden ist. Andererseits gibt es Hinweise darauf, daß die induzierte NO-Bildung eine Rolle in der Zerstörung der  $\beta$ -Zellen bei der Entwicklung eines Typ 1 Diabetes spielt.

Einige Studien befassen sich mit den geschlechtlichen Unterschieden von eNO. Kharitonov fand heraus, daß Frauen in der Zyklusmitte mehr NO ausatmen. Es wird darum auf eine hormonelle Beeinflussung der NO-Produktion geschlossen (Kharitonov et al. 1994b). Diese zyklusabhängigen Unterschiede bei eNO wurden von Jilma nicht bestätigt. In dieser Studie wurde aber ein Unterschied in den eNO-Werten zwischen Männern und Frauen festgestellt. Danach haben Männer im Schnitt höhere eNO-Werte als Frauen (Jilma et al. 1996). Eine dritte Studie konnte nun weder den Unterschied der eNO-Werte zwischen Männern und Frauen noch die zyklusabhängigen Unterschiede bestätigen (Morris et al. 1996).

### **1.3 Die Messung von NO**

NO ist ein Radikal mit kurzer Halbwertszeit von wenigen Sekunden. In Wasser, Ultrafiltrat und Plasma wird NO oxidiert, als Hauptprodukt dieser Reaktion entsteht Nitrit. In Vollblut bindet NO schnell an Hämoglobin und wird zu Nitrat umgewandelt, das dann mit einer Halbwertszeit von 5-8 Stunden im Urin ausgeschieden wird (Kelm et al. 1992). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die endogene NO-Freisetzung im Körper zu messen. Im Blut und im Urin können Nitrit und Nitrat bestimmt werden und somit Aufschluß über die NO-Bildung geben. Diese Möglichkeiten sind jedoch nicht unproblematisch. Es ist schwierig, die Nitratmenge im Urin als Indikator für endogen gebildetes NO heranzuziehen, da durch die NO-Inhalation aus der Umgebungsluft und durch die Nitritaufnahme aus der Nahrung (z.B. Salat) ein großer, variabler Bereich geliefert wird (Änggard et al. 1994). Die Zuordnung der Nitratmenge zu ihrem Entstehungsort ist nahezu unmöglich. Im Jahre 1995 ist es Vallance gelungen, die NO-Freisetzung direkt im Blut der oberflächlichen Venen zu messen. Dabei können Aussagen über die endogene NO-Bildung an der Stelle der Messung gemacht werden (Vallance et al. 1995). Neben der Bestimmung von NO in Blut und Urin ist es auch möglich, NO in der Atemluft zu messen. Es wurde bereits beschrieben, daß NO sowohl für den Gefäßtonus als auch für den Tonus der Bronchien von großer Wichtigkeit ist. Die Lunge ermöglicht durch die Fähigkeit des Gasaustausches eine Kommunikation zwischen Blut und Luft. Daß NO über die Lunge

abgeatmet wird und somit in der Atemluft nachweisbar ist, wurde erstmals 1991 beschrieben (Gustafsson et al. 1991).

Es gibt verschiedene technische Methoden, die zur quantitativen NO-Messung verwendet werden können. Auf einige von ihnen soll im folgenden eingegangen werden.

### **1.3.1 Elektrochemische Methode**

Mit elektrochemischen Methoden ist die quantitative Messung von NO in einzelnen Zellen und in Gewebe möglich. Durch die Benutzung von Ultramikroelektroden kann NO direkt in situ gemessen werden. Die elektrochemische Methode basiert auf der Oxidation von NO an festen Elektroden. Geht man davon aus, daß der Strom, der bei der NO-Oxidation erzeugt wird, linear proportional zur NO-Konzentration ist, so kann der Oxidationsstrom als analytisches Signal verwendet werden.

Generell kann gesagt werden, daß die Oxidation von NO an festen Elektroden über einen elektrochemischen Mechanismus in zwei Schritten verläuft. Der erste Schritt ist eine elektrochemische Reaktion, bei der ein Elektronentransfer von dem NO-Molekül auf die Elektrode erfolgt, dabei wird NO zu  $\text{NO}^+$ . Der zweite Schritt ist eine chemische Reaktion.  $\text{NO}^+$  ist in Anwesenheit von  $\text{OH}^-$  sehr reaktionsfreudig und wird zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ).

Schließlich wird Nitrit noch zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oxidiert, dem Endprodukt der elektrochemischen Reaktion. Die Messungen können sowohl in vitro als auch in vivo durchgeführt werden. Die Methode eignet sich ideal zur Charakterisierung labiler Systeme. Auch in Gasen wie z.B. der Atemluft ist die elektrochemische Messung möglich. Durch die langsame Ansprechzeit, den basalen Drift, die damit verbundene Ungenauigkeit und die Größe der Meßapparatur bleibt die Einsetzbarkeit der Methode für biologische Proben jedoch begrenzt (Malinski et al. 1996).

### **1.3.2 Photoakustische Spektroskopie**

Die Methode der photoakustischen Spektroskopie beruht auf dem sogenannten photoakustischen Effekt. Unter der Voraussetzung, daß ein Teil der in einer Probe absorbierten Strahlung in Wärme umgewandelt wird und die Elektronen über strahlungslose Deaktivierungsprozesse in den Grundzustand zurückkehren, sind Absorptionsspektren mit der Methode der photoakustischen Spektroskopie zu gewinnen. Dabei gelangt die in thermische Energie umgewandelte absorbierte Strahlung durch thermische Diffusion an die Probenoberfläche.

Periodische Bestrahlung erzeugt nach dem Übergang der Wärmewellen in den Gasraum periodische Druckschwankungen. Dieses akustische Signal läßt sich mit einem Druckwandler (Mikrofon) nachweisen. Der photoakustische Effekt wird nicht von Streu-, Lumineszenz- bzw. Phosphoreszenzlicht beeinflusst. Auch Proben, deren Absorptions- und Emissionsspektren sich überlappen, können durch die Möglichkeit des strahlungslosen Nachweises mit dem lichtunempfindlichen akustischen Detektor untersucht werden. Der photoakustische Detektor kann theoretisch für alle Spektralbereiche fast unabhängig von der Wellenlänge verwendet werden.

Die photoakustische Spektroskopie bietet viele anwendungstechnische Vorteile, besonders im Hinblick auf die Variabilität der Probenpräsentation, denn es können Proben in nahezu allen Zustandsformen, wie Pulver, Festkörper, Gele, Flüssigkeiten etc. ohne besondere Aufbereitungsverfahren untersucht werden. Einen weiteren Vorteil stellen die geringen Probenmengen, die kurzen Analysezeiten und die leichte Handhabung dar (Prehn et al. 1979).

### **1.3.3 Chemilumineszenz**

Die Chemilumineszenztechnik stellt eine weitere, komplizierte Methode zur Messung von NO dar. Dabei wird das in der Meßluft enthaltene NO mit Ozon zur Reaktion gebracht. Das hierbei entstehende NO<sub>2</sub> liegt in energetisch angeregtem Zustand vor und emittiert bei der Rückkehr in den Grundzustand Licht einer charakteristischen Wellenlänge. Die Lichtintensität wird als direktes Maß für die NO-Konzentration herangezogen. Das emittierte Licht wird gefiltert, in einem Photomultiplier verstärkt und in ein Stromsignal umgewandelt. Dieses Signal wird innerhalb eines Elektrometers in eine Spannung umgewandelt und weiter verstärkt, in einem AD-Wandler digitalisiert und im Mikroprozessor verarbeitet (Fontijn et al. 1970; Abbildung 2). Diese komplizierte Meßmethode hat den Nachteil, daß die Geräte recht groß sind und die Aufwärmphasen etwa 1-2 Stunden betragen.

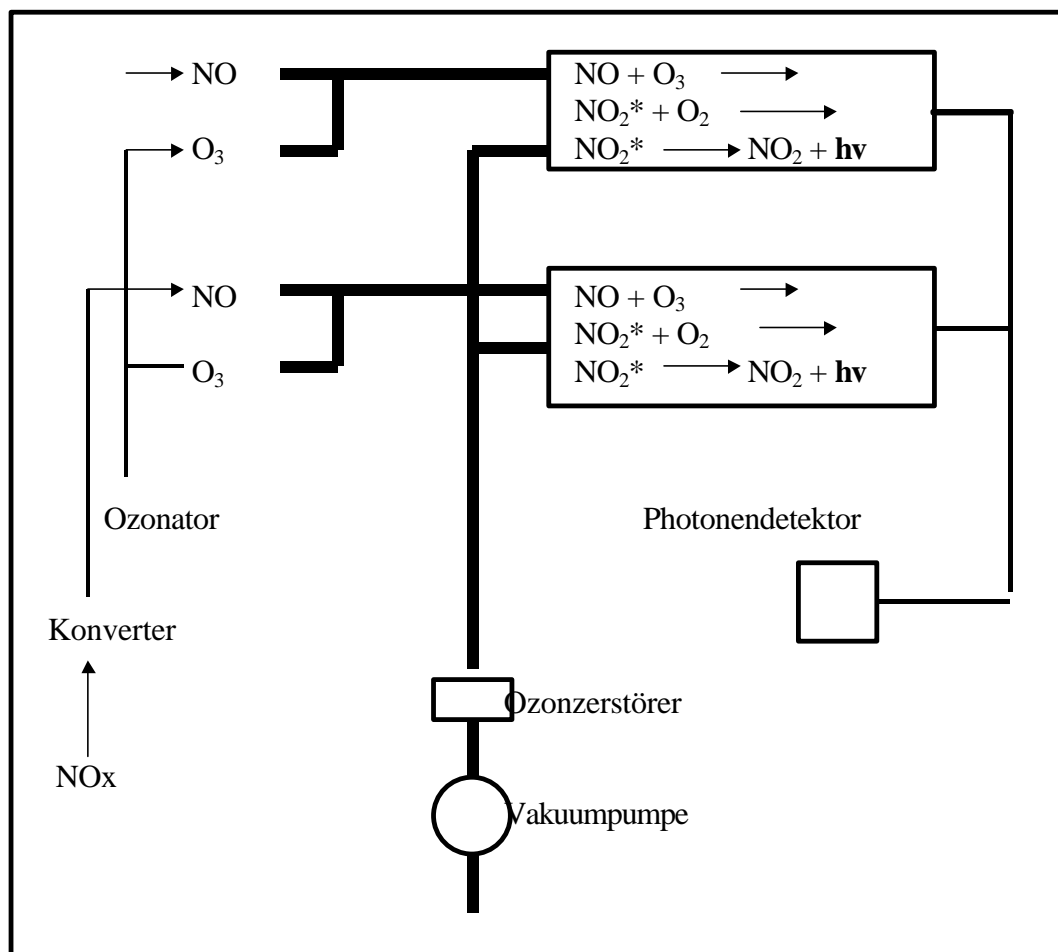


Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Funktion der Chemilumineszenztechnik

## **1.4 Zielsetzung der Untersuchung**

Wie bereits geschildert, hat NO wichtige Funktionen in der Regulierung des Gefäßtonus und des Bronchotonus. Einige Krankheiten gehen mit Veränderungen der Lungendurchblutung einher, die Ursache scheint in der veränderten NO-Freisetzung zu liegen. Bei Krankheiten wie Asthma bronchiale und Cystischer Fibrose findet sich eine veränderte NO-Freisetzung, ebenso bei Entzündungen der Atemwege. Lungengefäße haben eine enge anatomische und physiologische Beziehung zu den Atemwegen. Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß die NOS-Aktivität der Lungengefäße sich in der NO-Atemluftkonzentration widerspiegelt. Die Atemwege sind für eine Untersuchung recht einfach zugänglich. Möglicherweise sind die Unterschiede in der NO-Freisetzung bei verschiedenen Krankheiten diagnostisch nutzbar, indem die Atemluft auf NO hin analysiert wird. Die Verfahren sollten nichtinvasiv, einfach anwendbar und für Messungen an Kindern geeignet sein. Als Vorarbeit für unsere Untersuchungen wurde der verwendete Chemilumineszenz-NO-Analysator technisch verbessert.

### **1. Fragestellung:**

Läßt sich die NO-Freisetzung der unteren Atemwege messen?

Es war unser Ziel, NO-Kurven zu entwickeln, die den Verlauf von NO während eines Atemzyklus wiedergeben. Dabei wollten wir Informationen über den Entstehungsort von NO erhalten.

### **2. Fragestellung:**

Kann die NO-Bildung durch die Substrate der NOS stimuliert werden ?

Wir wollten überprüfen, ob sich der Einfluß der NO-Substrate L-Arginin und O<sub>2</sub> auf die NO-Bildung messen läßt. Durch die vielen Faktoren, die die endogene NO-Bildung oder Freisetzung beeinflussen, gestaltet sich die Interpretation der absoluten Meßwerte schwierig.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probanden

Die Messung von expiratorischem NO in der Ausatemluft gestaltet sich unter anderem deshalb als schwierig, weil die individuelle Schwankungsbreite der Werte sehr groß ist (Borland et al. 1993). Uns interessierte nun, ob es Möglichkeiten gibt, die NO-Bildung und

-Freisetzung zu beeinflussen, um so Aussagen über die Variation von eNO und mögliche Einflußfaktoren machen zu können. Dazu wurden unterschiedliche Messungen an verschiedenen Probandengruppen durchgeführt. Es wurden erwachsene Probanden und Kinder gemessen.

Die Teilnahme der erwachsenen Probanden war freiwillig, es handelte sich um Klinikpersonal und Studenten. Die Kinder, die an den Messungen teilgenommen haben, waren zum Zeitpunkt der Messung stationär in der Universitätskinderklinik Gießen aufgenommen. Ihre Teilnahme an den Messungen war freiwillig. Die Eltern der Kinder wurden mündlich um ihr Einverständnis gebeten.

Für die geplanten Messungen wurden 10 Probandengruppen benötigt, 7 Erwachsenengruppen und 3 Kindergruppen.

Tabelle 1: Probandengruppen

Probandengruppen	Messungen
Gruppe 1: Erwachsene	Meßgasvolumenstrommessungen
Gruppe 2: Erwachsene	Nasenmessungen
Gruppe 3: Erwachsene	Vergleichsmessungen eNO-Reservoir / eNO direkte Atemluftkurve
Gruppe 4: Erwachsene	Stabilität von eNO
Gruppe 5: Erwachsene	Einfluß der Umgebungsluft auf eNO
Gruppe 6: Erwachsene	Messungen zum Einfluß von Sauerstoff
Gruppe 7: Kinder	Messungen zum Einfluß von Sauerstoff
Gruppe 8: Kinder	eNO-Messungen unter L-Arginin-Belastung
Gruppe 9: Kinder	eNO-Messungen an intubierten Kindern
Gruppe 10: Erwachsene	eNO-Messungen an intubierten Erwachsenen

## **2.2 Ein- und Ausschlußkriterien**

Es ist noch nicht völlig klar, wodurch eNO beeinflusst wird und wie sich diese Beeinflussungen auswirken. Es gibt jedoch einige Faktoren, deren Wirkung auf eNO bekannt ist. Aufgrund dieser Faktoren, die nachfolgend weiter erläutert werden, wurden für die Probanden folgende Ein- und Ausschlußkriterien definiert.

### ***Einschlußkriterien***

- Mindestalter 4 Jahre ( nicht bei den intubierten Patienten)
- Sitzende Körperhaltung
- Kontrolle der eigenen Atmung
- Kooperationsbereitschaft (aktive Teilnahme der Probanden an den Messungen)

### ***Ausschlußkriterien***

- Chronisch obstruktive Lungenerkrankungen
- Asthma bronchiale
- Cystische Fibrose
- Infekte der oberen und unteren Atemwege
- Allergische Reaktionen
- Rauchen
- Kartagener's Syndrom
- Pulmonaler Hypertonus
- Glucocorticoidtherapie
- Fehlen der elterlichen Einwilligung bei den Kindern

Aus anderen Studien ist bekannt, daß die eben genannten Krankheiten und Faktoren die Freisetzung von eNO beeinflussen. Bei Patienten mit Asthma finden sich erhöhte NO-Werte in der Ausatemluft, wenn man sie mit den eNO-Werten einer Kontrollgruppe vergleicht (Kharitonov et al. 1994a; Dötsch et al. 1996). Unter der Therapie mit Glukokortikoiden geht die gesteigerte NO-Produktion zurück (Massaro et al.1995; Kharitonov et al. 1996a). Der Rückgang von NO geht mit einer Besserung der Lungenfunktion einher. Da der Rückgang der NO-Bildung durch Glukokortikoide nur bei Asthmatikern gezeigt werden konnte und nicht bei Gesunden, geht man davon aus, daß Glukokortikoide nur die iNOS und nicht die cNOS hemmen



(Yates et al. 1995). Aus diesen Gründen wurden Personen mit Asthma von den Messungen ausgeschlossen. Eine Therapie mit Glukokortikoiden war hingegen ein relatives Ausschlusskriterium, da der Glukokortikoideinfluss bei gesunden Probanden nicht bestätigt werden konnte. Auch bei Patienten mit Cystischer Fibrose finden sich, durch Entzündungen und Zellschäden, veränderte eNO-Werte (Dötsch et al. 1996). Bei Infekten der oberen und unteren Atemwege finden sich erhöhte eNO-Werte, da die Endothelzellen mit der Expression von iNOS auf proinflammatorische Zytokine antworten (Kharitonov et al. 1995a). Darum wurden auch Personen mit Infekten als Probanden ausgeschlossen.

Bei Rauchern finden sich häufig erniedrigte eNO-Werte, was vermutlich auf eine Hemmung der NO-Synthase zurückzuführen ist (Persson et al. 1994). Es könnte sich jedoch auch um eine Zerstörung der NO-bildenden Zellen handeln. Da es schwierig ist, konkrete Aussagen über die Dauer und die Größe des Einflusses von Zigarettenrauch auf eNO zu machen, schlossen wir regelmäßige Raucher von den Messungen aus. Bei Patienten mit dem Kartagener's Syndrom findet sich so gut wie kein NO in der Ausatemluft (Lundberg et al. 1994a). Auch diese Personen wurden von den Messungen ausgeschlossen.

Bei Patienten mit chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen kommt es durch die chronische Endothelschädigung zum Rückgang der endothel-abhängigen Relaxation durch NO (Dinh-Xuan et al. 1991). Bei Patienten mit pulmonalem Hypertonus finden sich niedrigere NO-Werte als bei Gesunden. Diese Verminderung findet sich als Reaktion auf das reduzierte pulmonalkapilläre Blutvolumen (Cremona et al. 1994). Diese beiden Personengruppen wurden ebenfalls aufgrund des nachgewiesenen Einflusses auf eNO von den Messungen ausgeschlossen. Aus den eben genannten Gründen wurde unsere Untersuchung zur Entwicklung von Methoden zur Messung von eNO nur mit lungengesunden Probanden durchgeführt, bei denen keine der aufgeführten Einschränkungen vorlag.

Um möglichst standardisierte Meßverhältnisse zu schaffen, wurden noch einige Punkte als Einschlusskriterien festgelegt, die von den Probanden erfüllt werden sollten. Sie sollten dazu in der Lage sein, ruhig und gleichmäßig zu atmen. Sie sollten eine aufrechte, sitzende Körperhaltung einnehmen. Ein Einfluss der Körperhaltung auf eNO ist zwar noch nicht sicher nachgewiesen, die sitzende Körperhaltung hat sich jedoch mittlerweile als Standardposition für Messungen bei Spontanatmung durchgesetzt (Kharitonov et al. 1997). Weiterhin sollten sich die Probanden möglichst wenig bewegen, da körperliche Aktivität, als physiologischer Stimulus, den Blutfluss steigert und dadurch ebenfalls Einfluss auf die endogene Bildung von NO ausübt (Schächinger et al. 1997). Diese Kriterien gelten gleichermaßen für alle Probandengruppen, ausgenommen die Gruppen 9 und 10 mit den intubierten Patienten. Die letzten drei Kriterien

setzen die Kooperation der Probanden voraus. Aus diesem Grund wurde für die Gruppen der Kinder ein Mindestalter von vier Jahren festgesetzt, um eine gewisse Kooperationsbereitschaft erwarten zu können. Ein weiterer Grund für die Festlegung des Mindestalters ist die Atmung. Kleine Kinder atmen oft schnell, jedoch sehr flach, was sich bei Vormessungen als problematisch erwiesen hat. Für die Messungen an intubierten Kindern galt diese Mindestalterregelung nicht.

Bei den nichtintubierten Probanden wurde ein gleichbleibender Flow während der Messungen durch ein zwischengeschaltetes Flowmeter sichergestellt. Bei den intubierten Probanden wurde das jeweilige Atemzugvolumen des Beatmungsgerätes notiert.

### **2.3 Meßtechnik**

Das verwendete Meßgerät bestimmt die NO-Konzentration von angebotener Luft mittels der Chemilumineszenztechnik (Stickoxidanalysator 3100, Firma UPM GmbH, Langgöns, Bundesrepublik Deutschland). Die Angabe der Meßwerte erfolgt in ppb.

An jedem Meßtag erfolgt nach der Aufwärmphase des Gerätes eine Gerätekalibrierung. Diese Kalibrierung wird mit zwei Gasen durchgeführt. Bei dem ersten Gas handelt es sich um ein sogenanntes Nullgas, welches NO-frei ist. Das zweite Gas hat einen NO-Gehalt von 50 ppb.

Bei den verwendeten Gasen (Firma Messer-Griesheim, Siegen, Deutschland) garantiert die Firma einen NO-Gehalt  $< 0,1$  ppb bei dem Nullgas und Abweichungen von höchstens  $\pm 0,5$  ppb bei dem NO-haltigen Gas.

Die Verarbeitung und Aufzeichnung der mit dem Chemilumineszenz-NO-Analysator gemessenen NO-Werte erfolgte mit der Windows-Software DASyLab (Data Acquisition System Laboratory, Firma DATALOG GmbH, Mönchengladbach, Deutschland). Dieses Programm erlaubt die Einbindung vieler Meß- und Steuerbords und die graphische Darstellung des Signalfusses mit höchstmöglicher Verarbeitungsgeschwindigkeit und optimaler Ergebnisdarstellung. Die Meßergebnisse können on-line oder off-line direkt dargestellt werden, sowohl graphisch als auch numerisch. Die Meßdaten sind speicherbar und zur späteren Analyse wieder ladbar. DASyLab ermöglicht eine online-Dokumentation parallel zur laufenden Messung, so daß die Messung am Probanden direkt am Monitor überwacht werden kann.

Die Kurven, die wir erhielten, waren verglichen mit den gleichmäßigen Kurven der Kapnometrie zunächst kaum zu verwenden. Oft fand sich anstelle einer Kurvenform mit Anstieg und Abfall ein durchgehendes Plateau. Mit zunehmenden Verbesserungen von Geschwindigkeit

und Empfindlichkeit des Gerätes konnte auch die Darstellung der eNO-Kurven verbessert werden. Durch die zeitliche Verzögerung, mit der das Gerät die Meßwerte aufgezeichnet hat, war es zudem schwierig, die NO-Kurven zeitlich dem Verlauf des Atemzyklus zuzuordnen. Aus diesem Grund wurde bei einigen Messungen ein Kapnometer zur Bestimmung von CO<sub>2</sub> angeschlossen.

Die Kurven bestehen aus zwei Anteilen. Zu Beginn der Kurve findet sich ein NO-Peak. Anschließend folgt ein NO-Plateau, welches am Ende abfällt. Zur Veranschaulichung wird eine von uns gemessene NO-Kurve in Abbildung 3 dargestellt. Welchen Schluß auf den Entstehungsort von NO dieser Kurvenverlauf zuläßt, wird im Diskussionsteil erörtert.

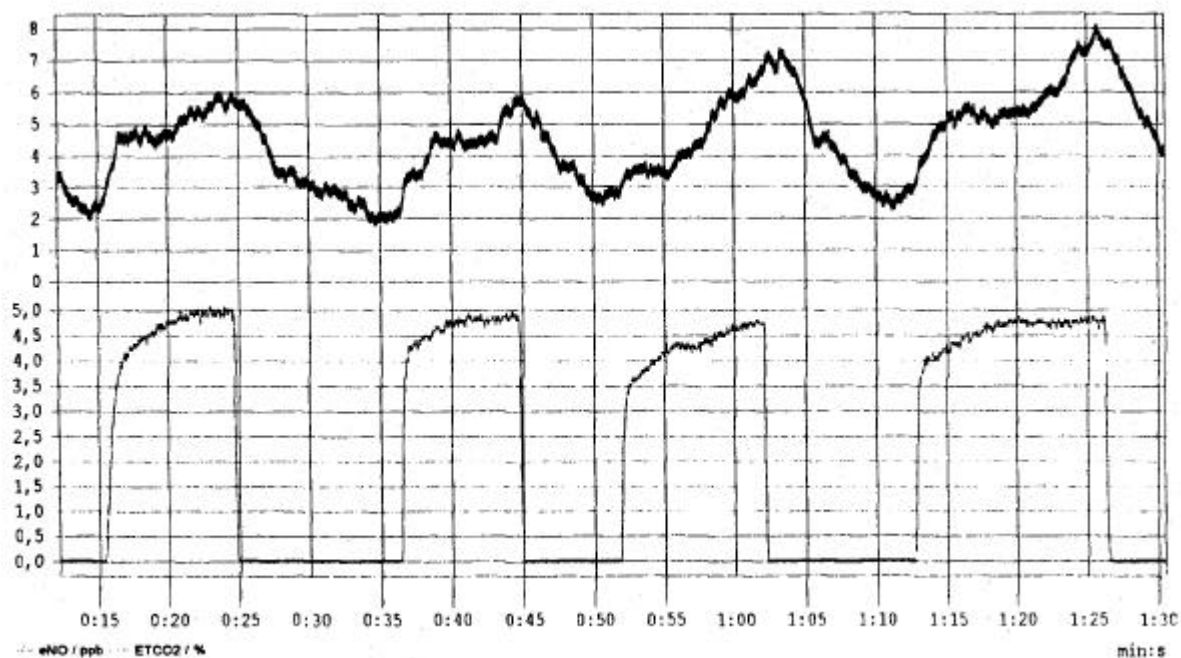


Abbildung 3: eNO-Kurve einer Probandin

Um die Feuchtigkeit aus der Atemluft der Probanden zu eliminieren, wurde eine Wasserfalle im Gerät eingebaut. Während der Messungen wurden Filter zwischen Proband und Gerät geschaltet, die ebenfalls die Ansammlung von Feuchtigkeit verhindern sollten.

Um eine Überhitzung der Meßzelle bei langen Laufzeiten des Gerätes (> 12 Stunden) in warmen, schlecht belüfteten Räumen zu verhindern, wurde ein Ventilator eingebaut.

Zur Verbesserung der Geräteempfindlichkeit erfolgten einige Umbauten an dem Analysator, welche von der Firma UPM GmbH durchgeführt wurden:

- Einbau eines zweiten Ozongenerators. Die Generatoren wurden in Reihe geschaltet.
- Für die Ozonerzeugung wurde Sauerstoff am Gerät mit einem Druck von 1,5 bar angeschlossen. Über den Druckregler im Gerät wurde der interne Druck des Sauerstoffs auf 1 bar eingestellt.
- Zur Verminderung der Zeitverzögerung wurden die Meßwege im Gerät verkürzt.
- Vergrößerung der Abtastrate von 50 Hz auf 500 Hz. Dadurch wurde das Rauschen verkleinert und die Aufzeichnung der Meßwerte verbessert.
- Das Meßgas wurde zur Trocknung über einen Nafion-Schlauch geleitet. Um die Zeitverzögerung möglichst kurz zu halten, wurde eine zusätzliche Pumpe eingebaut. Es wurde ein Meßgasvolumenstrom von 750 ml/min gefördert. Daraus wurde eine Meßgasmenge von ca. 180 ml/min der Reaktionskammer zugeführt.
- Der Elektrometerverstärker des Gerätes wurde auf eine niedrige Dämpfung eingestellt.
- Die Temperatur des Detektors wurde auf 2,5 °C herabgesetzt.
- Die Gaszufuhr an der Reaktionskammer wurde optimiert bzw. anders angeordnet.
- Durch den Einsatz einer leistungsfähigen Vakuumpumpe wurde eine Verbesserung der Empfindlichkeit und der Ansprechzeit des Gerätes erreicht.

## **2.4 Meßaufbau**

Nach den Ausführungen zum NO-Analysator soll nun der Aufbau der restlichen Meßapparatur beschrieben werden. Der Proband bekommt ein Kunststoffmundstück, über das ein- und ausgeatmet wird. Das Mundstück wird auf einen Einmalfilter gesteckt, der zwei Aufgaben hat. Zum einen soll er den Übertritt von Feuchtigkeit aus der Atemluft des Probanden in die folgenden Gerätepassagen verhindern, zum andern soll er die in der Atemluft enthaltenen Keime zurückhalten. Er soll auch verhindern, daß Keime aus dem Gerät zum Probanden gelangen. Filter und Mundstück werden nun auf ein Y-förmiges Kunststoffelement aufgesteckt. Darin

befinden sich zwei völlig voneinander getrennte Schenkel. In beiden Schenkeln befinden sich Ventile, die jeweils nur in eine Richtung durchlässig sind. Einer der Schenkel ermöglicht die Inspiration aus einem Reservoir, der andere Schenkel läßt bei Expiration Luft entweichen. An den inspiratorischen Schenkel wird über einen flexiblen Faltenschlauch ein großer PVC-Ballon mit einem Fassungsvermögen von 150 Litern angeschlossen. In ihm befindet sich ein NO-freies, synthetisches Luftgemisch aus  $N_2$  und  $O_2$ . Am expiratorischen Schenkel findet sich eine kleine Anschlußstelle, die erst über einen Teflonschlauch, später über einen Nafionschlauch mit dem Analysator verbunden ist. Über diese Schlauchverbindung wird stetig ausgeatmete Luft des Probanden aus dem expiratorischen Schenkel angesaugt. Da der Analysator mit einem Sog von 750 ml/min arbeitet, soll die Meßluft drucklos angeboten werden. Darum wurde mit dem Ventil des expiratorischen Schenkels ein Überlauf für die restliche Ausatemluft geschaffen (Abbildung 4).

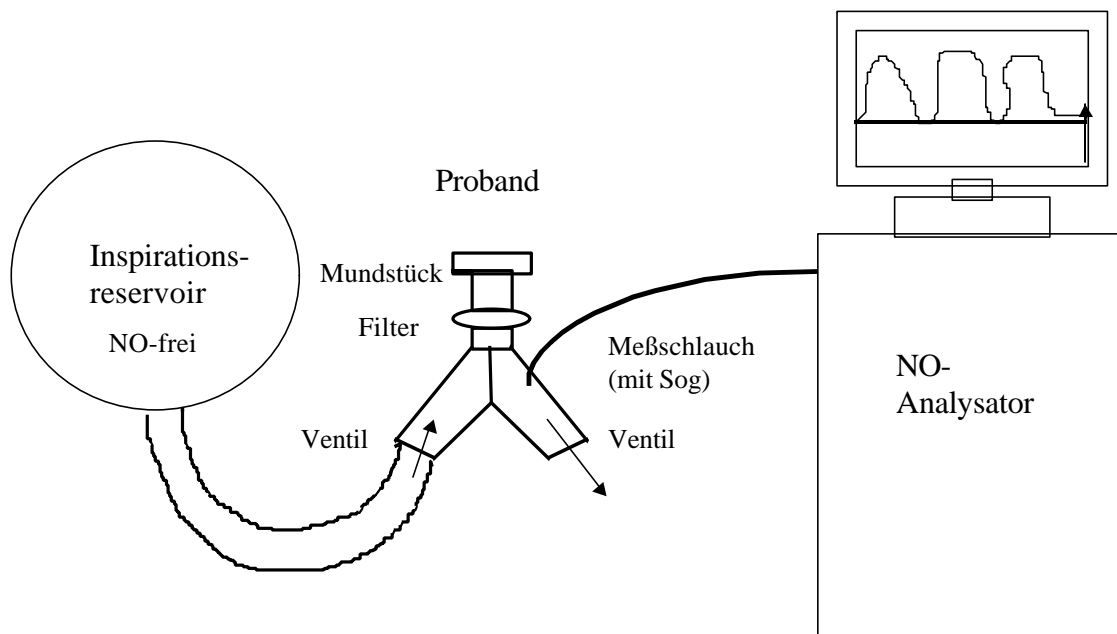


Abbildung 4: Meßaufbau

Um das drucklose Anbieten der Meßluft auch bei erwachsenen Probanden mit großen Atemminutenvolumina zu gewährleisten, wurde ein Durchflußmeßgerät zwischen Meßschlauch und Analysator geschaltet. Es zeigt den Durchfluß während der Messungen konstant an. Somit konnten wir uns vergewissern, daß die Atemmanöver der Probanden keinen Einfluß auf den Meßluftfluß zum Gerät hatten.

Für unsere Messungen war die Mundatmung der Probanden von Bedeutung, da uns die NO-Produktion in den unteren Atemwegen interessierte. In anderen Studien wurde herausgefunden,

daß der größte Teil der endogenen NO-Produktion, etwa 90 %, der Nase entstammt (Schedin et al. 1995).

Um nun die Nase bei den Messungen möglichst auszuschalten, bekamen die Probanden Nasenklemmen. Vor jeder Messung wurde den Probanden der Meßablauf erklärt und demonstriert. Zu Beginn einer jeden Messung wurde eine gewisse Voratemzeit von etwa 10 Atemzügen abgewartet, um dem Probanden Zeit zur Eingewöhnung zu geben. Diese Voratemzeit sollte außerdem dazu dienen, das noch in der Lunge vorhandene NO aus der Umgebungsluft möglichst auszuwaschen. Anlaufschwierigkeiten zu Beginn der Atmung und Verzögerungen durch das Gerät konnten somit vermindert werden. Durch die Aufzeichnung der Atemkurven am Monitor war es möglich, die NO-Werte im Verlauf des Atemzyklus zu beobachten. Die Patientenbewegung zum Zeitpunkt der Messung konnte berücksichtigt werden, und dadurch wurde die Auswertung der Meßwerte erleichtert.

Bei den intubierten Probanden wurde der Meßschlauch des Gerätes über einen zwischengeschalteten Adapter mit dem Beatmungstubus verbunden, so daß das Meßgas direkt aus dem Tubus angesaugt wurde. Die Nase und der Rachen wurden auf diesem Wege als NO-Quelle ausgeschaltet.

## **2.5 Meßmethoden**

Wegen großer interindividueller Unterschiede ist es schwierig, eNO-Absolutwerte verschiedener Personen direkt miteinander zu vergleichen. Aus diesem Grunde haben wir den Einfluß verschiedener Faktoren auf die NO-Bildung und NO-Freisetzung untersucht. Wir wollten herausfinden, ob es Möglichkeiten gibt, die NO-Bildung zu beeinflussen, um auf indirektem Wege Aussagen über die Funktion der NOS und die endogene NO-Produktion machen zu können. Unser Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung des Einflusses der Substrate der NOS, L-Arginin und O<sub>2</sub>, auf die endogene NO-Bildung.

### **2.5.1 Untersuchung zum Meßgasvolumenstrom**

Der NO-Analysator, mit dem die Messungen durchgeführt wurden, arbeitet mit einem Sog. Der Meßgasvolumenstrom ist variabel einstellbar. Er kann zwischen 1500 ml/min und 250 ml/min verändert werden. Es stellte sich die Frage, ob die unterschiedlichen Volumenströme Einfluß auf die eNO-Ergebnisse haben. Wir wollten wissen, bei welchem Gasvolumenfluß die Messungen stabil sind, um festzulegen, mit welchem Fluß die späteren Messungen durchgeführt

werden sollten. Darum wurden an jedem Probanden der Gruppe 1 nacheinander fünf Messungen von eNO bei fünf verschiedenen Meßgasvolumenströmen durchgeführt: 1500 ml/min, 1000 ml/min, 750 ml/min, 500 ml/min, 250 ml/min.

Die Probanden atmeten während der Messungen ohne Unterbrechung, zwischen den unterschiedlichen Volumenströmen wurden keine Pausen gemacht. Die Ströme wurden während der Messung verändert. Nach jeder Veränderung des Volumenstromes wurde eine Voratemzeit von mindestens 10 Atemzügen eingehalten, bevor mit der Wertung der eNO-Ergebnisse begonnen wurde. Die Probanden atmeten während der gesamten Messung NO-freie, synthetische Luft mit einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 21 % aus einem Inspirationsreservoir ein.

Durch einen Schwebekörperdurchflußmesser wurde sichergestellt, daß die Probanden den am Gerät eingestellten Meßgasvolumenstrom nicht beeinflusst haben.

### **2.5.2 Nasenmessungen**

Ziel unserer Messungen war es, etwas über die endogene NO-Produktion in den unteren Atemwegen herauszufinden. Aus anderen Studien geht hervor, daß ein Großteil des endogenen NO, welches in der Ausatemluft gemessen werden kann, in der Nase und in den Nasennebenhöhlen gebildet wird (Lundberg et al. 1994a; Kharitonov et al. 1997). Um diese Ergebnisse für unsere Untersuchung zu bestätigen, führten wir NO-Messungen in der Nase an Probandengruppe 2 durch. Vor Beginn der Messung wurden die Probanden gebeten, sich ruhig auf einen Stuhl zu setzen, dann wurde ihnen der Meßvorgang erklärt und demonstriert. Zur Messung wurde den Probanden eine Nasensonde mit einem Schaumstoffende in ein Nasenloch eingeführt. Das zweite Nasenloch wurde verschlossen. Um die Beeinflussung durch diesen mechanischen Reiz zu reduzieren, wurde anschließend abgewartet, bis der Proband sich beruhigt hatte. Während der Messung wurden die Probanden gebeten, ruhig und entspannt zu sitzen und die Augen geschlossen zu halten. Atmen sollten die Probanden durch den Mund. Die NO-Messung erfolgte über 3 Minuten, vom Gerät wurde dann ein Mittelwert über diese Zeit berechnet. Anschließend wurde die Messung im anderen Nasenloch wiederholt. Aus den NO-Werten beider Nasenlöcher wurde schließlich ein Mittelwert gebildet.

### 2.5.3 Vergleichsmessungen zwischen Reservoir und Atemluftkurve

Eine andere Untersuchung unserer Gießener Arbeitsgruppe zeigte bereits Unterschiede in den expiratorischen NO-Werten, z.B. bei Patienten mit Asthma (Dötsch et al. 1996). Bei diesen Messungen wurde die ausgeatmete Luft in Beuteln aufgefangen und dann das Luftgemisch gemessen. Der Nachteil dieser Messungen liegt darin, daß man stets ein Gemisch aus allen Atemphasen mißt und kaum Aussagen über eNO-Maxima im Verlauf der Atmung machen kann. Unser Ziel war es nun, Atemluftkurven herzustellen, mit denen genauer differenziert werden kann, aus welchen Teilen der Atemwege das ausgeatmete NO stammt. Hohe NO-Werte am Kurvenanfang sprechen dabei für eine NO-Bildung in den oberen Teilen der Atemwege, vor allem in der Nase, während hohe NO-Werte am Kurvenende die NO-Bildung in den tieferen Atemwegen repräsentieren.

Es stellte sich die Frage, inwiefern die eNO-Messung aus einem Reservoir mit einer direkten Atemluftkurve vergleichbar ist. Als Voruntersuchungen wurden an Probandengruppe 3 zwei Meßmethoden verglichen:

1. Messung der in einem Reservoirbeutel aufgefangenen Ausatemluft, die alle Atemphasen umfaßt
2. Messung des endexpiratorischen Plateaus der Atmung

Bei der ersten Messung wurde, nach einer gewissen Voratemzeit, die expiratorische Luft mehrerer Atemzüge in einem Kunststoffbeutel aufgefangen. Es wurde sichergestellt, daß das Beutelmateriel keine Diffusion von NO aus der Umgebung in den Beutel erlaubt und kein NO freisetzt, so daß das gesamte NO aus der Luft des Probanden stammen muß. Ist der Beutel gefüllt, wird der Meßschlauch des Analysators angeschlossen und die Luft zum Gerät gezogen. Bei der zweiten Messung wird die Ausatemluft der Probanden nicht in einem Beutel aufgefangen. Jeder Atemzug wird direkt aufgezeichnet, mit Werteanstieg, Maximum, Plateau und Werteabfall.



#### 2.5.4 Messungen zur Stabilität von eNO

NO ist ein ubiquitär vorkommendes Gas, welches, wie bereits erwähnt, durch viele Faktoren beeinflusst wird, z.B. Entzündungen (Kharitonov et al. 1995a) oder Aktivität (Persson et al. 1993). NO wird endogen in den Atemwegen gebildet (Gaston et al. 1994). Es kann aber auch exogen zugeführt werden, z.B. als therapeutische Inhalation in der pädiatrischen Intensivmedizin (Demirakca 1997). Eine weitere Form der exogenen NO-Zufuhr liegt in der Belastung der Umgebungsluft mit NO, der wir täglich ausgesetzt sind.

Aufgrund der vielen beeinflussenden Faktoren wurden Untersuchungen zur Stabilität und Variabilität der eNO-Werte durchgeführt. Wir wollten herausfinden, ob die eNO-Werte einer Person über mehrere Messungen an einem Tag konstant sind, oder ob es sich um ständig fluktuierende Werte handelt. Weiterhin wurde die Wiederholbarkeit der Meßwerte einer Person an unterschiedlichen Tagen untersucht.

Die Stabilitätsmessungen wurden an Probandengruppe 4 durchgeführt:

1. Eine Messung pro Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen
2. Fünf aufeinanderfolgende Messungen an einem Tag

Die erste Meßreihe wurde an allen Meßtagen zur gleichen Tageszeit durchgeführt. Die Probanden wurden täglich nach Veränderungen des gesundheitlichen Wohlbefindens befragt. Die Messung sollte in keinem zeitlichen Zusammenhang zu größeren körperlichen Aktivitäten stehen. An allen fünf Tagen wurden die Messungen mit NO-freier inspiratorischer Luft durchgeführt. Es erfolgten stets zwei Messungen hintereinander. Die Erste wurde mit einer inspiratorischen O<sub>2</sub>-Konzentration (FiO<sub>2</sub>) von 21 % durchgeführt, die Zweite mit einem FiO<sub>2</sub> von 50 %. An allen Meßtagen wurde der NO-Gehalt der Umgebungsluft ermittelt.

Bei der zweiten Meßreihe erfolgten die fünf Messungen an einem Tag. Zwischen den einzelnen Messungen wurden kurze Pausen von ca. 2 Minuten gemacht. Zu Beginn jeder neuen Messung wurde eine Voratemzeit von mindestens 10 Atemzügen eingehalten, um die zwischenzeitlich eingeatmete, NO-haltige Umgebungsluft aus der Lunge des Probanden auszuwaschen. Auch diese Meßreihe wurde mit einem FiO<sub>2</sub> von 21 % und 50 % durchgeführt.

### 2.5.5 Einfluß der Umgebungsluft auf eNO

NO kommt nahezu überall in der Umwelt vor. Der NO-Gehalt der umgebenden Luft kann von Tag zu Tag wechselnde Werte annehmen. Je nach Wetterlage und Schadstoffbelastung können Werte zwischen 0 ppb und mehreren 100 ppb vorkommen. Kharitonov beschreibt 1997 NO-Umgebungswerte aus Finnland, die zwischen 1-2 und 600 ppb variieren (Kharitonov et al. 1997). Wir haben für unsere Messungen NO-freie Luft zur Inspiration verwendet, um die Meßmethoden zu standardisieren. Normalerweise atmen wir keine synthetische, NO-freie Luft ein. Um der Frage nachzugehen, ob die NO-haltige Umgebungsluft einen Einfluß auf die endogene NO-Produktion und NO-Freisetzung hat und ob sie die eNO-Werte beeinflussen kann, wurden zwei Vergleichsmessungen an Probandengruppe 5 durchgeführt:

1. NO-Messungen bei Inspiration von Umgebungsluft ( $\text{NO} > 0$ )
2. NO-Messungen bei Inspiration von synthetischer, NO-freier Luft

Mit jedem Probanden wurden zwei Messungen durchgeführt. Bei der ersten Messung wurde über das Ventil auf der Inspirationsseite normale Umgebungsluft eingeatmet. Bei der zweiten Messung atmeten die Probanden NO-freie Luft aus dem Reservoir ein, der Sauerstoffgehalt lag bei 21 %.

Die Voratemzeit, die vor jeder Messung eingehalten wurde, dient unter anderem auch dazu, die NO-haltige Umgebungsluft aus den Lungen der Probanden auszuwaschen.

Vor jeder Probandenmessung wurde der NO-Gehalt der Umgebungsluft ermittelt, um Aussagen über den Unterschied von eNO bei den beiden Messungen machen zu können.

### 2.5.6 Einfluß von O<sub>2</sub> auf die NO-Produktion

Die Beurteilung von eNO-Werten gestaltet sich aufgrund der bereits beschriebenen interindividuellen Unterschiede schwierig. Um Aussagen über die NO-Entstehung machen zu können, wurde der Einfluß der Substrate der NOS untersucht. Die endothelspezifische konstitutive Isoform der NOS (ecNOS) ist ein komplexes Enzym, welches zur NO-Produktion verschiedene Kofaktoren wie reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Flavin-Adenin-Dinucleotid, Flavin-Mononucleotid und Tetrahydrobiopterin benötigt. Durch Oxidation der Guanidinogruppe des **L-Arginins** mit **Sauerstoff** werden

äquimolare Mengen **NO** und Citrullin gebildet. Das entstandene NO diffundiert in die glatte Muskelzelle und führt durch die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und zur Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Moncada & Higgs 1993; Ignarro et al. 1989), es kommt zur Vasorelaxation. Bei Betrachtung dieser Physiologie wird der Zusammenhang zwischen den Substraten der NOS und dem entstehenden NO sehr deutlich. Wir untersuchten nun, ob durch quantitative Veränderung der Substratmenge eine Beeinflussung des Produkts NO möglich ist. Eine Voraussetzung dafür ist das ausreichende Vorhandensein des Enzyms NOS. Diese Messungen bilden den Schwerpunkt der Arbeit, da sie sich mit den Grundvoraussetzungen für die eNO-Bildung beschäftigen, mit dem NO-bildenden Enzym. Es erfolgten Messungen an Erwachsenen und an Kindern. An der Kindergruppe wurden zusätzlich eNO-Messungen während Luftanhalten durchgeführt.

#### ***2.5.6.1 Sauerstoffprovokationsmessungen an Erwachsenen***

Mit Probandengruppe 6 wurden eNO-Messungen bei fünf unterschiedlichen inspiratorischen O<sub>2</sub>-Konzentrationen durchgeführt. Die verwendeten FiO<sub>2</sub>-Werte waren:

10 %, 21 %, 35 %, 50 %, 100 %.

Die einzelnen Messungen wurden jeweils von zweiminütigen Pausen unterbrochen. Mit jedem Probanden wurden zwei Messreihen durchgeführt. Die erste Messreihe wurde mit einem FiO<sub>2</sub> von 21 % begonnen. Es folgten drei Messungen mit steigendem FiO<sub>2</sub> (35 %, 50 %, 100 %). Anschließend wurde bei jedem Probanden eine zweite Meßreihe durchgeführt. Nach der Messung mit 21 % FiO<sub>2</sub> erfolgte die Hypoxiemessung mit 10 % FiO<sub>2</sub>. Auch hier wurde vor jeder Messung die Voratemzeit eingehalten, um die Lungen der Probanden mit der neuen O<sub>2</sub>-Konzentration zu durchströmen.

Die Hypoxiemessung wurde unter Kontrolle der peripheren Sauerstoffsättigung durchgeführt. Die Messung wurde begonnen, wenn die Sättigung auf ca. 80 % abgefallen war. Bei Abfall der Sättigung unter 80 % beendeten wir die Provokation. Bei der Hypoxiemessung war stets ein Arzt anwesend, Sauerstoff war vorhanden.

### **2.5.6.2 Sauerstoffprovokationsmessungen an Kindern**

Nachdem die Provokationsmöglichkeiten durch O<sub>2</sub> bei den erwachsenen Probanden mit fünf verschiedenen FiO<sub>2</sub>-Werten umfassend getestet wurden, führten wir Provokationsmessungen an Kindern durch. Bei den Messungen der Probandengruppe 7 beschränkten wir uns auf die FiO<sub>2</sub>-Werte 21 % und 50 %.

Die Messungen wurden nach dem selben Procedere durchgeführt, wie die Messungen an den erwachsenen Probanden. Auf die Hypoxiemessung, die eine zusätzliche Belastung für die Probanden darstellt, haben wir bei den Kindern verzichtet.

### **2.5.6.3 Atemmanöver: „Breathholding“**

Im Rahmen der Sauerstoffprovokationsmessungen wurden mit einem Teil der Kinder der Probandengruppe 7 weitere Messungen durchgeführt. Das Ziel war nach wie vor, die NO-Freisetzung zu stimulieren und zu erhöhen. Aus anderen Studien geht hervor, daß eNO durch einfaches Luftanhalten der Probanden erhöht werden kann. Es ist nicht völlig klar, ob es sich bei der Erhöhung um eine vermehrte Anreicherung von NO aus den tieferen Atemwegen handelt. Es wird eher vermutet, daß ein großer Teil des NO aus dem Nasen-Rachen-Raum stammt (Kimberly et al. 1996).

Die Messung wurde im Rahmen der Sauerstoffprovokation durchgeführt. Am Ende der Messung wurden die Kinder gebeten, nach der Inspiration für ca. 20-30 Sekunden die Luft anzuhalten und dann langsam und gleichmäßig auszuatmen. Dieses Manöver erfordert ein hohes Maß an Kooperation und ein gewisses Alter der Probanden. Darum konnte das Breathholding nur mit 16 der 28 Kinder bei 21% FiO<sub>2</sub> durchgeführt werden. Bei den Messungen mit 50% FiO<sub>2</sub> waren nur noch 10 dieser 16 Kinder erneut zum Luftanhalten bereit.

### **2.5.7 NO-Messung unter Arginin-Belastung**

Neben O<sub>2</sub> ist auch L-Arginin ein Substrat der NOS (Moncada et al. 1989). Darum sollte nun der Einfluß von L-Arginin auf die NO-Produktion gemessen werden.

Die Messung wurde an Probandengruppe 8 durchgeführt. Die Kinder dieser Gruppe unterzogen sich alle aufgrund eines Kleinwuchses einem diagnostischen Arginin-Belastungstest. Mit diesem Test sollte herausgefunden werden, ob dem Kleinwuchs ein Mangel an

Wachstumshormon (Somatotropin) zugrunde liegt. L-Arginin kann die Sekretion von Wachstumshormon aus dem Hypophysenvorderlappen stimulieren und wird darum für pharmakologische Stimulationstests eingesetzt. Bei diesem Test werden den Kindern 0,5 g Arginin pro Kilogramm Körpergewicht als Lösung von L-Arginin-Monohydrochlorid (10 %) über 30 Minuten intravenös infundiert. Anschließend werden über einen Zeitraum von zwei Stunden regelmäßige Blutentnahmen zur Hormonbestimmung durchgeführt. Während dieses Tests wurden nun von uns eNO-Messungen gemacht.

Es handelte sich insgesamt um sechs Messungen:

Die erste Messung erfolgte vor der Arginingabe, die zweite erfolgte direkt nach Ende der Infusion, weitere vier Messungen erfolgten dann jeweils in 30minütigem Abstand nach 30, 60, 90 und 120 Minuten. Die Messungen erfolgten mit zwei  $\text{FiO}_2$ -Werten von 21 % und 50 %.

#### **2.5.8 NO-Messungen an intubierten Probanden**

Aus anderen Untersuchungen ist bereits bekannt, daß ein großer Teil des in expiratorischer Luft meßbaren NOs aus der Nase stammt (Schedin et al. 1995). Um herauszufinden, welcher Anteil von eNO aus den tieferen Atemwegen stammt haben wir eNO-Messungen an intubierten Patienten der Gruppen 9 und 10 durchgeführt.

Bei Gruppe 9 handelt es sich um intubierte und beatmete Kinder. Wie bereits beschrieben, erfolgte die Messung über einen zwischen Tubus und Beatmungsschlauch zwischengeschalteten Adapter, der mit dem Meßschlauch des NO-Analysators verbunden war. Pro Proband wurden zwei Messungen durchgeführt. Die erste Messung erfolgte mit einem  $\text{FiO}_2$  zwischen 21%-31%. Die periphere Sauerstoffsättigung ( $\text{SO}_2$ ) der Probanden lag bei diesen Messungen im Mittel bei 95%. Nach einer Meßzeit von etwa fünf Minuten wurde der  $\text{FiO}_2$  am Beatmungsgerät auf Werte zwischen 50%-100% erhöht, bis zum Erreichen einer peripheren Sauerstoffsättigung von 99-100%. Anschließend erfolgte die nächste Messung für etwa fünf Minuten.

Bei Gruppe 10 handelt es sich um intubierte Erwachsene. Die Messungen erfolgten wie an Gruppe 9. Sowohl die Änderungen von  $\text{FiO}_2$  als auch der Meßmodus waren identisch. Der Anstieg der  $\text{SO}_2$  von etwa 95% auf 99-100% war auch hier der Parameter zum Start der zweiten Messung.

## **2.6 Studienprotokoll**

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt. Jeder Proband wurde vorab über den genauen Ablauf der Messung informiert. Die Teilnahme war freiwillig und konnte bei Bedenken jederzeit abgebrochen werden. Bei den Kindern wurden die Eltern um Erlaubnis gebeten.

Da unterschiedliche Meßreihen an unterschiedlichen Probandengruppen durchgeführt wurden, erstellten wir folgende unterschiedliche Meßprotokolle.

Vor und während jeder Messung wurden folgende Daten erhoben:

In Gruppe 1 bis 3: Persönliche Daten zum Probanden (Name, Alter, Geschlecht, akute oder chronische Lungenerkrankungen, Allergien, Raucher, Befinden zum Zeitpunkt der Messung).

In Gruppe 4 und 5: Persönliche Daten zum Probanden (Name, Alter, Geschlecht, akute oder chronische Lungenerkrankungen, Allergien, Raucher, Befinden zum Zeitpunkt der Messung). Vor Beginn der Probandenmessung wurde der NO-Wert der Raumluft notiert.

In Gruppe 6: Die Erfassung der persönlichen Daten zum Probanden erfolgte ebenso wie in den Gruppen 1 bis 5. Wegen der Hypoxiemessung wurde hier zusätzlich die periphere Sauerstoffsättigung der Probanden notiert.

In Gruppe 7: Neben den persönlichen Daten wurde die Atemfrequenz bestimmt.

Da sich der größte Teil dieser Probandengruppe zum Zeitpunkt der Messung in stationärer Behandlung befand, wurde die Aufnahmediagnose notiert. Bei der Medikation interessierte die Einnahme von Glukokortikoiden. Vor der Probandenmessung wurde der Raumluft-NO-Wert bestimmt. Nach erfolgter Messung wurde die Kooperationsbereitschaft notiert.

In Gruppe 8: Die Erfassung der Daten erfolgte wie in Gruppe 7. Neben Diagnose und Glukokortikoidtherapie wurde auch hier Raumluft-NO und Kooperation der Probanden notiert.

In Gruppe 9 und 10: Neben den persönlichen Daten zum Probanden (Name, Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe) wurden die Diagnosen notiert. Bei der Medikation wurde auf Antibiotika- und Kortikoidgabe geachtet. Wir notierten weiterhin zwei Entzündungsparameter (CRP, Leukozyten) und verschiedene Beatmungsgrößen (AZV, AMV, AF). Während der eNO-Messung wurde die Änderung von  $SO_2$  bei Änderung von  $FiO_2$  vermerkt.

## **2.7 Statistik**

Bei den vorliegenden intervallskalierten Daten konnte prinzipiell von einer Normalverteilung der Grundgesamtheit ausgegangen werden. Diese Daten wurden deshalb in Mittelwerten  $\pm$  SD angegeben.

Die Darstellung der Verteilung der Daten erfolgte mit Methoden der deskriptiven Statistik. Mittelwerte  $\pm$  SD wurden mittels Excel 5.0 für Windows® in Diagrammform veranschaulicht.

Die Vergleichsuntersuchung der Direktmessung und der Messung aus einem expiratorischen Reservoir sowie die Vergleichsuntersuchung zur Stabilität von eNO über mehrere Messungen an einem oder an verschiedenen Tagen wurden nach der Methode von Bland und Altman ausgewertet, womit es möglich ist, die Übereinstimmung zweier Werte zu beurteilen (Bland & Altman 1995).

Die eNO-Werte der unterschiedlichen Messungen (z.B. Untersuchung zum Meßgasvolumenstrom, Einfluß von  $O_2$ , Einfluß der Umgebungsluft, Einfluß von Arginin) wurden mittels nichtparametrischer Tests (Rangsummentest nach Wilcoxon und Rangvarianzanalyse nach Friedmann) hinsichtlich signifikanter Änderungen geprüft, da bei einigen Messungen lediglich eine Gruppengröße von 7 bzw. 8 Probanden vorlag. Die Unterschiede wurden bei einem  $p < 0.05$  als signifikant erachtet. Die statistische Analyse wurde mittels SPSS für Windows®, Version 6.1 durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Probandengruppen

Zunächst soll ein Überblick über die 10 Probandengruppen und die jeweiligen Messungen gegeben werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Probandengruppen

Probanden			Messungen
Gruppe	Anzahl	Alter	
1	11	20-40 J	Meßgasvolumenstrommessungen
2	17	22-29 J	Nasenmessungen
3	18	20-26 J	Vergleichsmessungen eNO-Reservoir / eNO direkte Atemluftkurve
4	15	20-40 J	Stabilität von eNO
5	20	20-45 J	Einfluß der Umgebungsluft auf eNO
6	10	23-29 J	Messungen zum Einfluß von Sauerstoff
7	28	5-17 J	Messungen zum Einfluß von Sauerstoff
8	7	4-14 J	eNO-Messungen unter L-Arginin-Belastung
9	10	1/12-13 J	eNO-Messungen an intubierten Kindern
10	9	23-83 J	eNO-Messungen an intubierten Erwachsenen

Bei den Probandengruppen handelt es sich um 7 Erwachsenengruppen und 3 Kindergruppen. Da für die meisten Probanden die gleichen Auswahlkriterien galten, können sie zusammengefaßt beschrieben werden.

#### Gruppen 1-6:

Es handelt sich um gesunde, freiwillige Erwachsene, in deren Anamnese sich zum Zeitpunkt der Messung weder akute noch chronische Atemwegs- und Lungenerkrankungen fanden. Allergische Reaktionen lagen nicht vor, alle Personen waren Nichtraucher.

*Gruppe 1:* 11 Probanden, 6 Männer, 5 Frauen, Alter 20-40 Jahre (Median 26 Jahre).

*Gruppe 2:* 17 Probanden, 11 Männer, 6 Frauen, Alter 22-29 Jahre (Median 24 Jahre).

*Gruppe 3:* 18 Probanden, 11 Männer, 7 Frauen, Alter 20-26 Jahre (Median 25 Jahre).

*Gruppe 4:* 15 Probanden, 5 Männer, 10 Frauen, Alter 20-40 Jahre (Median 26 Jahre).

*Gruppe 5:* 20 Probanden, 9 Männer, 11 Frauen, Alter 20-45 Jahre (Median 30 Jahre).

*Gruppe 6:* 10 Probanden, 5 Männer, 5 Frauen, Alter 23-29 Jahre (Median 27 Jahre).



### Gruppe 7:

Bei dieser Gruppe handelt es sich um Kinder und Jugendliche, die sich, bis auf drei gesunde Geschwisterkinder, zum Zeitpunkt der Messung in stationärer Behandlung auf den Stationen Köppe und Pfaundler der Kinderklinik Gießen befanden (Tabelle 3). Es handelt sich um 14 Jungen und 14 Mädchen im Alter von 5-17 Jahren (Median 10 Jahre). Erkrankungen der Atemwege und der Lunge lagen bei den Probanden anamnestisch nicht vor, auch Allergien waren nicht bekannt.

### Gruppe 8:

In dieser Gruppe befinden sich 4 Jungen und 3 Mädchen im Alter von 4-14 Jahren (Median 8 Jahre), die sich zum Zeitpunkt der Messung einem Arginin-Belastungstest auf der Tagesstation Heubner der Kinderklinik Gießen unterzogen. Dieser Test wurde durchgeführt, um die Ursache für den Kleinwuchs der Patienten herauszufinden (Tabelle 4). Vor den Messungen wurden auch bei diesen Patienten akute und chronische Atemwegs- und Lungenerkrankungen anamnestisch ausgeschlossen, ebenso allergische Reaktionen.

Tabelle 3 : Probandengruppe 7

Anzahl	Alter/ Jahre	Geschlecht	Diagnose
3	5, 15, 17	2 w, 1 m	gesund
5	7, 8, 11, 13, 14	2 w, 3 m	Fazialisparese
6	6, 6, 8, 12, 12, 13	2 w, 4 m	V.a. cerebrales Krampfleiden
3	13, 16, 17	2 w, 1 m	Diabetes mellitus
2	10, 12	2 w	chronische Osteomyelitis (keine akuten Entzündungszeichen)
6	6, 8, 9, 9, 9, 10	3 w, 3 m	Patienten nach chirurgischen Eingriffen ohne pulmonale Affektionen
1	6	1 m	Nabelfistel
1	13	1 w	Kopfschmerzen
1	10	1 m	Purpura Schoenlein-Henoch (keine akuten Entzündungszeichen)

Tabelle 4: Probandengruppe 8

Proband	Alter	Geschlecht	Diagnose
1	14	m	juvenile rheumatoide Arthritis (keine akuten Entzündungszeichen)
2	4	w	Ullrich-Turner-Syndrom
3	8	m	V.a. Noonan-Syndrom
4	4	m	V.a. Muskeldystrophie, V.a. familiären Kleinwuchs
5	9	m	Z.n. Medulloblastom, V.a. gestörte Wachstumshormonsekretion
6	10	w	Ullrich-Turner-Syndrom
7	5	w	V.a. septo-optische Dysplasie, Amaurosis beidseits, V.a. Wachstumshormonmangel

**Gruppe 9:**

Bei den 10 Probanden dieser Gruppe, 5 Jungen und 5 Mädchen, handelt es sich um intubierte und beatmete Kinder der Station Bessau der Universitätskinderklinik Gießen im Alter von 1 Monat-13 Jahren (Median 17 Monate, Tabelle 5).

**Gruppe 10:**

In dieser Gruppe befinden sich 9 intubierte und beatmete Erwachsene der operativen Intensivstation der Universitätsklinik Gießen. Bei den Probanden handelt es sich um eine Frau und 8 Männer im Alter von 23-83 Jahren (Median 66 Jahre). Alle Patienten dieser Gruppe wurden zum Zeitpunkt der Messung druckkontrolliert beatmet (Tabelle 6).

Tabelle 5: Probandengruppe 9

Proband	Alter	Geschlecht	Diagnose
1	2 J	w	Orbitabodenfraktur, Oberschenkelfraktur, Z.n. OP
2	2 J	w	ASD 1, MI, TI, Z.n. VSD- und ASD-Verschluß
3	1 ½ J	m	V.a. eosinophiles Granulom frontal, Z.n. Craniotomie
4	½ J	m	ASD 2, PS, VSD, Z.n. VSD- und ASD-Verschluß, Z.n. Pulmonalklappenkommissurotomie
5	13 J	w	cerebrale Raumforderung frontoparietal
6	13 J	m	Z.n. hypothyreotem Koma, Autoimmunthyreoiditis
7	6/12 J	w	infantile epileptische Encephalopathie, BNS-Krämpfe
8	5/12 J	m	Dens-Fraktur, Z.n. OP (C1/C2-Fusion)
9	1/12 J	w	Choanalatresie
10	6/12 J	m	Hepatoblastom, Wiedemann-Beckwith-Syndrom

Tabelle 6: Probandengruppe 10

Proband	Alter	Geschlecht	Diagnose
1	73 J	w	Anastomoseninsuffizienz nach Rektum-OP, Sepsis
2	23 J	m	Polytrauma
3	27 J	m	Polytrauma
4	83 J	m	V.a. Myokardinfarkt
5	68 J	m	Rundherd linker Lungenunterlappen, Z.n. Resektion
6	53 J	m	Pneumektomie rechts
7	68 J	m	respiratorische Insuffizienz
8	68 J	m	Ösophagus-Carzinom, Z.n. Ösophagusresektion
9	40 J	m	Schädelhirntrauma

### 3.2 Gruppe 1: Meßgasvolumenstromuntersuchung

Die Messungen zum Meßgasvolumenstrom wurden mit Probandengruppe 1 durchgeführt. Sie sollten Aufschluß darüber geben, ob der am Analysator eingestellte Meßgasvolumenstrom die eNO-Werte der Probanden beeinflusst. An jedem Probanden wurden fünf Messungen mit fünf unterschiedlichen Meßgasvolumenströmen zwischen 1500 ml/min und 250 ml/min durchgeführt (Abbildung 5). Bei Betrachtung der Meßwerte fällt auf, daß die niedrigsten eNO-Werte bei dem größten und dem kleinsten Meßgasvolumenstrom gemessen wurden. Bei den mittleren Meßgasvolumenströmen von 1000 ml/min, 750 ml/min und 500 ml/min liegen die gemessenen eNO-Mittelwerte bei 10 ppb, 11 ppb und 9 ppb. Die Abweichungen dieser drei Mittelwerte sind gering und befinden sich im Bereich der Meßungenauigkeit des Analysators.

Die statistische Auswertung mit dem Friedmann-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den fünf Meßgasvolumenströmen auf ( $p=0.0001$ , Chi-Quadrat 30.03). Der mittlere Rang war bei einem Meßgasvolumenstrom von 750 ml/min am größten, dort fanden sich die höchsten NO-Werte. Wir entschieden uns dazu, alle folgenden Messungen mit einem einheitlichen Meßgasvolumenstrom von 750 ml/min durchzuführen.

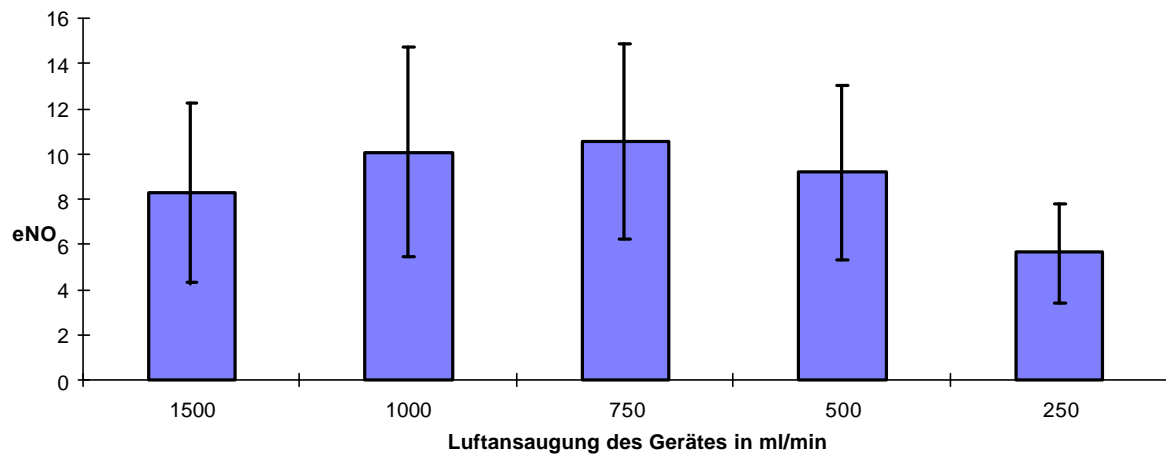


Abbildung 5: Untersuchung zum Meßgasvolumenstrom  
 Gruppe 1: 11 Probanden, 20-40 Jahre  
 eNO-Messungen mit unterschiedlichen Flows des Gerätes  
 eNO-Angabe in ppb

### 3.3 Ergebnisse der Nasenmessungen

Die Nasenmessungen an Probandengruppe 2 zeigten Nasen-NO-Werte von  $147 \pm 92$  ppb (Abbildung 6). Der Wilcoxon-Test zeigt den signifikanten Unterschied zwischen Mund- und Nasen-NO-Werten ( $p=0.001$ ). Verglichen mit den eNO-Werten aus dem Mund liegen die Nasen-NO-Werte etwa 10-15 mal höher.

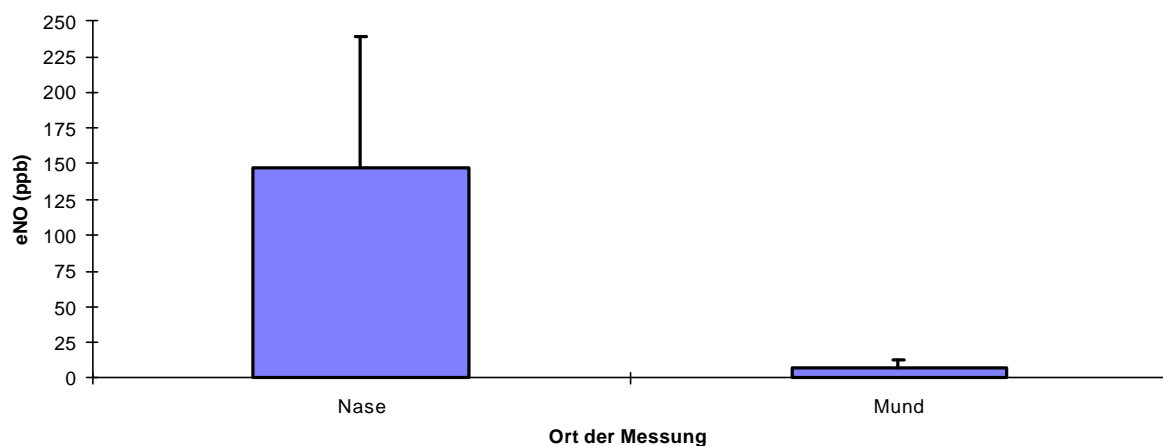


Abbildung 6: Ergebnisse der Nasenmessungen von NO im Vergleich zur Mundmessung von NO

### 3.4 Ergebnisse der Vergleichsmessungen von eNO-Reservoir und

#### eNO-Atemluftkurve

Um herauszufinden, inwieweit sich die eNO-Werte der Messung aus einem Beutelreservoir und der Plateaumessung (direkte Atemluftkurve) voneinander unterscheiden, wurden die Vergleichsmessungen an Probandengruppe 3 durchgeführt. Bei den Messungen von eNO aus einem Beutelreservoir, bei denen die expiratorische Luft aller Atemphasen des Probanden vermischt wurde, ergab sich ein Meßwert von  $5 \pm 4$  ppb. Der eNO-Meßwert der direkten Atemluftkurven lag mit  $9 \pm 5$  ppb um 4ppb höher als der Mittelwert der Reservoirmessungen. Die eNO-Reservoirwerte eines jeden Probanden wurden nun gegen die eNO-Plateauwerte (direkte Atemkurve) in einem Achsendiagramm als Punktwolke aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  ergab mit einem Wert von 0,83 eine hohe Korrelation der beiden Meßmethoden (Abbildung 7). Um die Übereinstimmung der beiden Meßmethoden zu objektivieren, wurde ein Bland-Altman-Plot erstellt (Abbildung 8).

Der Mittelwert der Differenzen lag bei 3, die beiden Meßwerte eines Probanden weichen im Mittel um 3 ppb voneinander ab. Das 95%-Vertrauensintervall erstreckte sich von -3 bis +9 über einen Bereich von 12 ppb.

Nach Bland-Altman liefern die beiden Meßmethoden keine vergleichbaren Werte. Da uns der Kurvenverlauf von eNO und die NO-Produktion in den unteren Atemwegen interessierte, entschieden wir uns für die Direktmessung der Atemluftkurve.

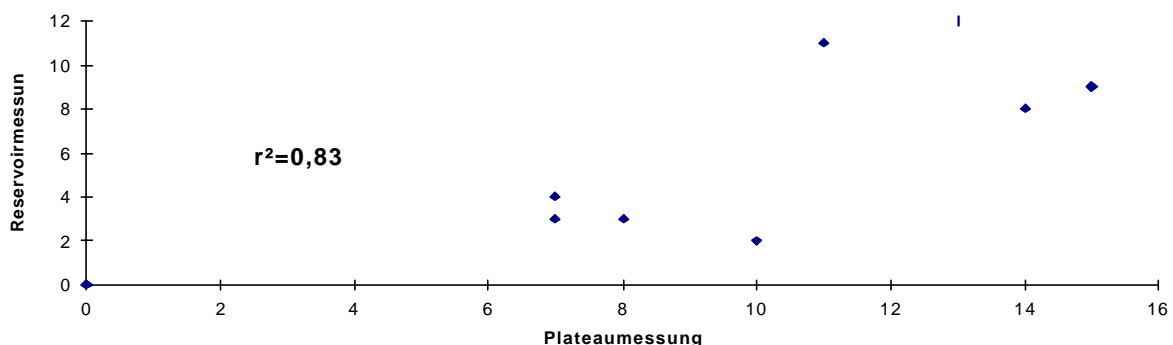


Abbildung 7: Punktediagramm zum Vergleich der Meßwerte bei Reservoirmessung und bei Plateaumessung  
 $r^2$  = Korrelationskoeffizient  
Gruppe 3: 18 Probanden, 20-26 Jahre

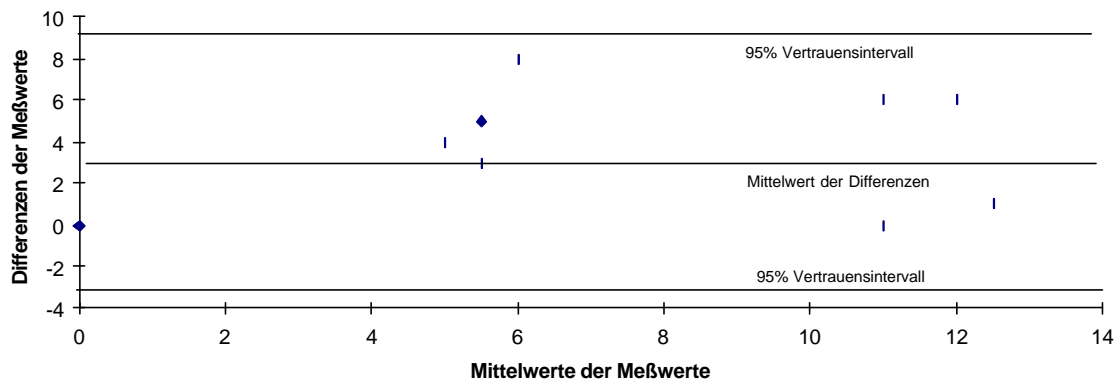


Abbildung 8: Bland-Altman-Plot zum Vergleich von eNO-Direkt und eNO-Reservoir  
Gruppe 3: 18 Probanden, 20-26 Jahre

### 3.5 Ergebnisse der Messungen zur Stabilität von NO

#### 3.5.1 Ergebnisse der Messungen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen

Um Aussagen über die Stabilität und Wiederholbarkeit von eNO machen zu können, wurden zwei unterschiedliche Meßreihen mit Probandengruppe 4 durchgeführt. Bei der ersten Meßreihe wurden 5 der 15 Probanden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen je einmal zur gleichen Zeit gemessen. Neben den eNO-Werten der Probanden wurden die Umgebungs-NO-Werte zum Zeitpunkt der Messung bestimmt. Jeder Proband wurde mit einem  $\text{FiO}_2$  von 21% und von 50% gemessen (Tabelle 7).

Tabelle 7: eNO-Mittelwerte der Stabilitätsmessungen an fünf Tagen  
hellgrau unterlegt: MW, SD und Variationskoeffizient (V)  
der Messungen bei 21% FiO<sub>2</sub>  
dunkelgrau unterlegt: MW, SD und V der Messungen bei 50% FiO<sub>2</sub>

eNO	MW (21% FiO <sub>2</sub> )	SD (21% FiO <sub>2</sub> )	V (21% FiO <sub>2</sub> )	MW (50% FiO <sub>2</sub> )	SD (50% FiO <sub>2</sub> )	V (50% FiO <sub>2</sub> )
Umgebung	27	±32	1,17	27	±32	1,17
1. Proband	10	±3	0,25	13	±4	0,28
2. Proband	4	±2	0,48	4	±1	0,28
3. Proband	8	±4	0,57	10	±6	0,62
4. Proband	9	±1	0,17	11	±2	0,21
5. Proband	12	±1	0,13	16	±2	0,14

Die erhaltenen Meßwerte sind interindividuell sehr unterschiedlich. Die Daten wurden mit dem Bland-Altman-Plot ausgewertet, um Aussagen zur Stabilität der Meßwerte machen zu können (Abbildung 9). Hierbei wurden nur die Daten verwendet, die bei den Messungen mit 21% FiO<sub>2</sub> gemessen wurden.

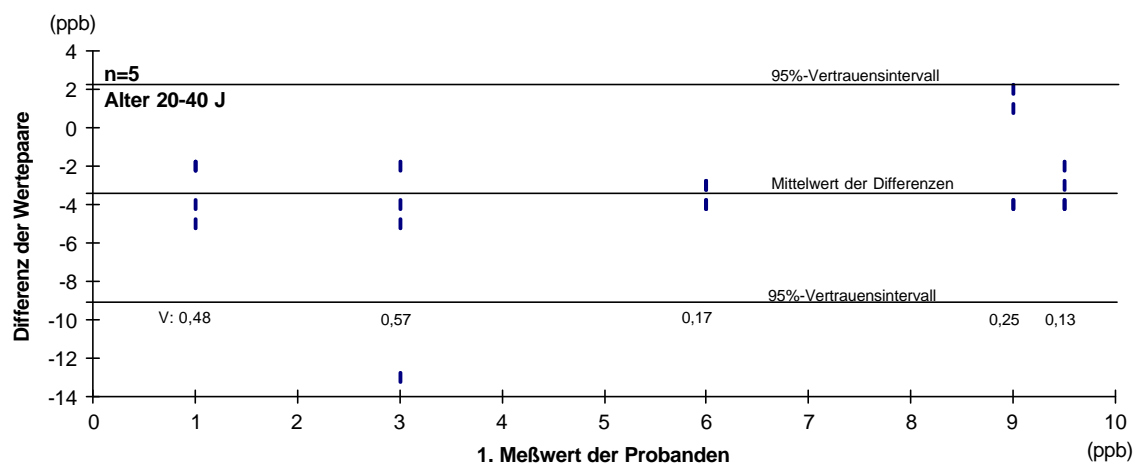


Abbildung 9: Bland-Altman-Plot zur Stabilität und Wiederholbarkeit von eNO einer Person an fünf aufeinanderfolgenden Tagen  
V=Variationskoeffizient

Aus den Daten jedes Probanden werden die Differenzen zwischen seinem ersten Meßwert und den folgenden vier Werten gebildet, es ergeben sich maximal vier Differenzen pro Proband. Die Differenzen werden jeweils gegen den ersten Meßwert des Probanden aufgetragen, für jeden Probanden ergibt sich eine vertikal angeordnete Reihe von Werten.

Der Mittelwert der Differenzen liegt bei etwa -3,5, die mittlere Abweichung zweier Meßwerte eines Probanden liegt also bei etwa 3,5 ppb. Das 95%-Vertrauensintervall erstreckt sich von +2 bis -9 über eine Spanne von 11 ppb. Um noch mehr Informationen über die Wertestabilität zu erhalten, wurden für die Werte jedes Probanden die Variationskoeffizienten berechnet. Bei den fünf Probanden liegt der kleinste Variationskoeffizient bei 0,13 und der größte bei 0,57.

### 3.5.2 Ergebnisse der fünf aufeinanderfolgenden Messungen an einem Tag

Nachdem die Stabilitätsmessungen an den unterschiedlichen Tagen große Schwankungen aufgezeigt haben, interessierte nun, wie stabil und reproduzierbar die eNO-Werte einer Person innerhalb eines Tages sind. Es wurden fünf aufeinanderfolgende Messungen an einem Tag mit 10 Probanden der Gruppe 4 durchgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: eNO-Mittelwerte der Stabilitätsmessungen an einem Tag

	MW (21% FiO <sub>2</sub> )	SD (21% FiO <sub>2</sub> )	V (21% FiO <sub>2</sub> )	MW (50% FiO <sub>2</sub> )	SD (50% FiO <sub>2</sub> )	V (50% FiO <sub>2</sub> )
<b>1. Proband</b>	5	±0	0,08	5	±0	0,08
<b>2. Proband</b>	1	±0	0	3	±0	0,14
<b>3. Proband</b>	5	±0	0,09	7	±1	0,16
<b>4. Proband</b>	14	±1	0,05	17	±1	0,05
<b>5. Proband</b>	16	±2	0,13	18	±4	0,20
<b>6. Proband</b>	25	±1	0,06	23	±1	0,05
<b>7. Proband</b>	9	±1	0,07	10	±1	0,08
<b>8. Proband</b>	6	±0	0,08	7	±0	0,07
<b>9. Proband</b>	6	±1	0,12	8	±0	0,05
<b>10. Proband</b>	7	±0	0,07	7	±0	0,07



Die Mittelwerte der Probanden liegen zwischen 1 und 25 ppb (bei 21% FiO<sub>2</sub>) mit Standardabweichungen zwischen 0 und 2 ppb und Variationskoeffizienten zwischen 0 und 0,13. Bei 50% FiO<sub>2</sub> liegen die Mittelwerte der Probanden zwischen 3 und 23 ppb mit Standardabweichungen zwischen 0 und 4 ppb und Variationskoeffizienten zwischen 0,05 und 0,2. Bereits hier wird deutlich, daß die Abweichungen der eNO-Werte geringer sind als bei den Messungen an verschiedenen Tagen. Zur Objektivierung erfolgte die Auswertung der Daten der Messungen mit 21% FiO<sub>2</sub> mit dem Bland-Altman-Plot (Abbildung 10).

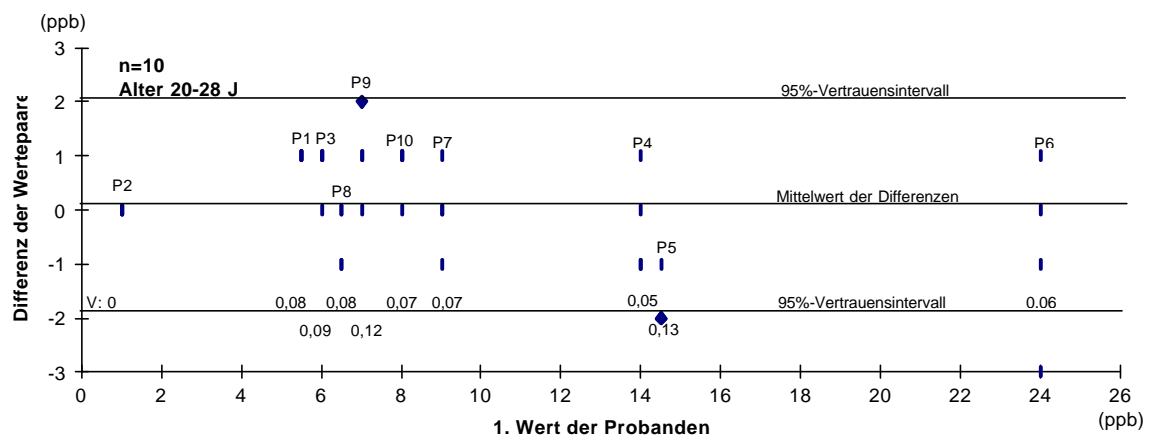


Abbildung 10: Bland-Altman-Plot zur Stabilität von eNO bei fünf aufeinanderfolgenden Messungen an einem Tag  
V= Variationskoeffizient; P1-P10=1. Proband-10. Proband (siehe Tabelle 8)

Zur Auswertung nach Bland und Altman werden die Differenzen zwischen dem ersten und den folgenden vier Meßwerten jedes Probanden gebildet. Diese Differenzen werden gegen den ersten Meßwert des Probanden im Achsendiagramm aufgetragen, so daß sich für jeden Probanden eine Reihe von maximal vier vertikal angeordneten Punkten ergibt. Der Mittelwert der Differenzen liegt nahe Null, die Meßwerte des einzelnen Probanden weichen kaum voneinander ab, sie sind relativ stabil.

Das 95%-Vertrauensintervall erstreckt sich von -2 bis +2 über 4 ppb. Es ist damit wesentlich geringer als das 95%-Vertrauensintervall der Messungen über fünf Tage. Vergleicht man die Werte aller Probanden, so ergeben sich große Unterschiede. Es finden sich eNO-Werte zwischen 1 und 25 ppb. Die Werte der einzelnen Probanden zeigen jedoch im Hauptmeßbereich lediglich Abweichungen zwischen -1 und +1 ppb. Bei höheren Meßwerten finden sich etwas größere Abweichungen (bis 3 ppb), die jedoch ebenfalls geringer sind als die Abweichungen der Messung über fünf Tage. Die Variationskoeffizienten liegen zwischen 0 und 0,13.

Betrachtet man die Werte der einzelnen Probanden im Bland-Altman-Plot genauer, so fällt auf, daß der 2. Proband nur einen Wertepunkt bei 1 ppb hat. Auf der Y-Achse liegt dieser Punkt bei Null, daß heißt, daß alle Werte des Probanden gleich waren. Bei dem 1. Probanden findet sich ein Punkt bei etwa 5 ppb (X-Achse). Auf der Y-Achse liegt dieser Wert bei +1. In diesem Fall gab es nur eine Differenz der eNO-Werte um 1 ppb. Lediglich der erste Meßwert war anders, die folgenden vier waren identisch. Der 6. Proband, dessen erster Meßwert bei 24 ppb liegt, weist vier unterschiedliche Punkte auf. Hier konnten vier Differenzen gebildet werden. Eine Differenz liegt auf der Y-Achse bei Null, das bedeutet, daß ein Meßwert doppelt vorkam. Wenn ein Proband weniger als vier Punkte aufweist, sind mindestens zwei Meßwerte doppelt gemessen worden.

### 3.6 Ergebnisse der Messungen zum Einfluß der Umgebungsluft auf eNO

Um den Einfluß des NO-Gehaltes der Umgebungsluft auf die eNO-Werte einer Person zu untersuchen, wurden an Probandengruppe 5 zwei Messungen durchgeführt, die erste mit einem Umgebungs-NO  $> 0$  und die zweite mit einem Umgebungs-NO  $= 0$ . Der eNO-Wert aller Probanden, die während der ersten Messung normale Raumluft mit NO  $> 0$  eingeatmet haben, lag bei  $13 \pm 4$  ppb. Der NO-Gehalt der umgebenden Raumluft lag im Mittel bei  $25 \pm 7$  ppb. Der eNO-Wert der Probanden, der bei Inspiration von synthetischer Luft mit NO  $= 0$  gemessen wurde, lag bei  $9 \pm 5$  ppb (Abbildung 11).

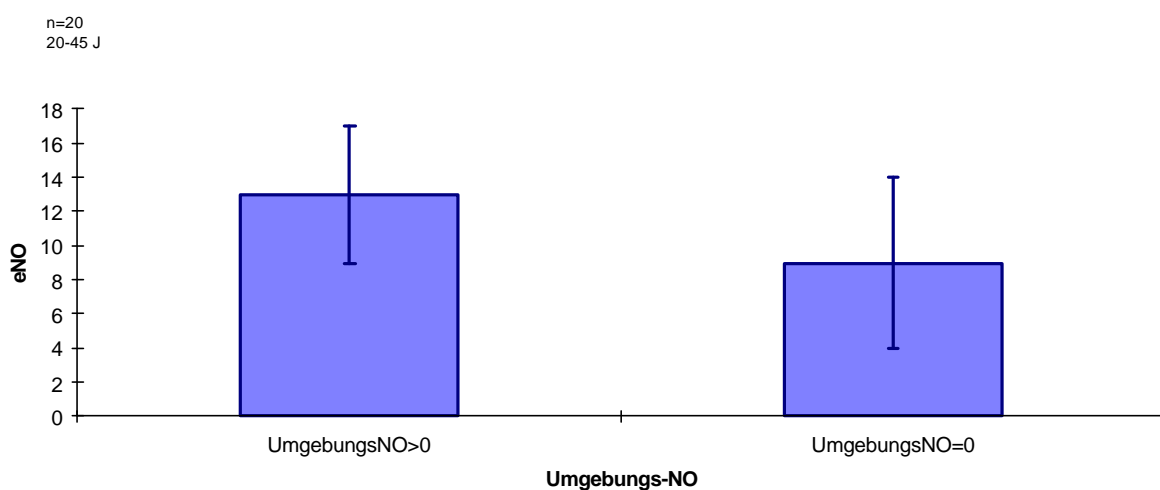


Abbildung 11: Einfluß der Umgebungsluft auf eNO  
Vergleich von eNO bei unterschiedlichem NO-Gehalt der Inspirationsluft

Die eNO-Werte, die bei Inspiration NO-haltiger Luft gemessen wurden, liegen um etwa 4 ppb höher als die eNO-Werte, die bei Inspiration NO-freier Luft gemessen wurden. Im Wilcoxon-Test zeigt sich, daß der Unterschied bei den beiden Messungen signifikant ist ( $p=0.0002$ ). Um herauszufinden, ob die Änderung der eNO-Werte immer gleichgerichtet ist, wurden die eNO-Werte jedes einzelnen Probanden in einem Liniendiagramm gegenübergestellt (Abbildung 12).

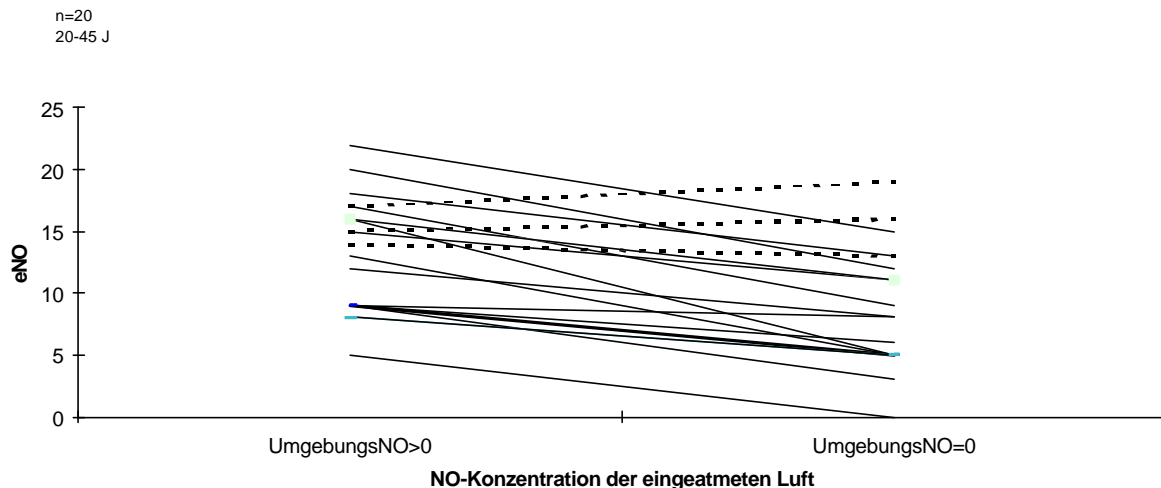


Abbildung 12: Einfluß der Umgebungsluft auf eNO  
Vergleich von Wertepaaren bei eNO-Messungen mit unterschiedlichem NO-Gehalt der von den Probanden eingeatmeten Luft

Bei Betrachtung des Liniendiagramms mit der Gegenüberstellung der einzelnen Meßwerte finden sich 17 Probanden, bei denen die eNO-Werte unter Umgebungs-NO  $> 0$  höher sind als bei NO-freier Inhalationsluft (durchgezogene Linien in Abbildung 12). Dieses Ergebnis beschreibt auch das Säulendiagramm (Abbildung 11). In der Aufschlüsselung der einzelnen Werte finden sich jedoch auch drei Fälle, bei denen die eNO-Werte von der Inhalation NO-haltiger Luft zur Inhalation NO-freier Luft ansteigen (gestrichelte Linien in Abbildung 12). Die Reaktionen der endogenen NO-Bildung und -Freisetzung auf die äußeren Umstände der Messung sind nicht bei allen Probanden einheitlich.

### 3.7 Ergebnisse der Messungen zum Einfluß von Sauerstoff

#### 3.7.1 Ergebnisse der Messungen an Gruppe 6

Aufgrund des physiologischen Schwankungsbereichs der eNO-Werte ist es schwierig, eNO-Absolutwerte miteinander zu vergleichen. Den Schwerpunkt der Arbeit stellen nun die Messungen zum Einfluß der Substrate der NOS auf die endogene NO-Bildung und Freisetzung dar.

Die Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub> wurden an Probandengruppe 6 durchgeführt. In zwei voneinander getrennten Versuchen wurden Messungen mit insgesamt fünf unterschiedlichen inspiratorischen O<sub>2</sub>-Konzentrationen durchgeführt.

Bei dem ersten Versuch mit Gruppe 6 wurden vier Messungen mit ansteigendem FiO<sub>2</sub> von 21% bis 100% durchgeführt.

Tabelle 9: MW und SD der Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub>

	21 % FiO <sub>2</sub>	35 % FiO <sub>2</sub>	50 % FiO <sub>2</sub>	100 % FiO <sub>2</sub>
MW ± SD	6 ± 4	11 ± 4	12 ± 5	11 ± 4

Bei den Messungen kam es zu einem signifikanten mittleren Anstieg des eNO von 6 ± 4 ppb bei 21% FiO<sub>2</sub> auf 12 ± 5 ppb bei 50% FiO<sub>2</sub> (p=0.002). Durch eine stufenweise Steigerung des Substrats von FiO<sub>2</sub> 21% auf FiO<sub>2</sub> 100% läßt sich, bei ausreichender Anwesenheit der NOS, eine signifikante Steigerung des Produkts erreichen (p=0.001). Eine weitere Erhöhung des FiO<sub>2</sub> von 50% auf 100% führt nicht zu einer weiteren Erhöhung von eNO, die Werte bleiben bei diesen beiden Messungen annähernd gleich, der Unterschied der eNO-Werte bei FiO<sub>2</sub> 50% und FiO<sub>2</sub> 100% ist nicht signifikant (p=0.4795; Abbildung 13).

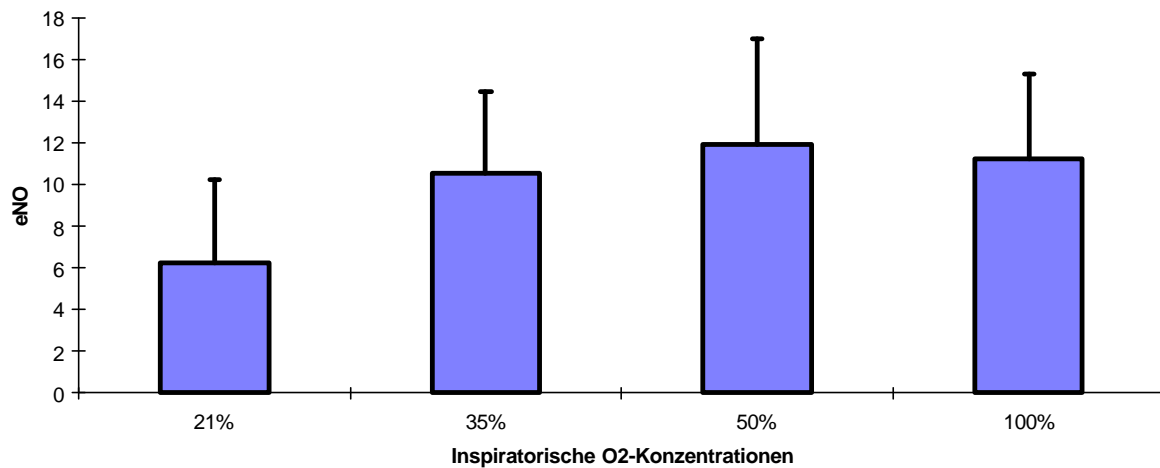


Abbildung 13: eNO-Werte bei vier unterschiedlichen Konzentrationen von FiO<sub>2</sub> gemessen an Gruppe 6

Nach der Messung mit den vier ansteigenden inspiratorischen O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde mit denselben Probanden eine weitere Untersuchung mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen für FiO<sub>2</sub> durchgeführt. Auch hier erfolgte zunächst eine eNO-Messung bei einem FiO<sub>2</sub> von 21%. Anschließend wurde eine Hypoxiemessung mit 10% FiO<sub>2</sub> durchgeführt. Es zeigte sich ein Abfall des eNO von  $7 \pm 2$  ppb bei 21% FiO<sub>2</sub> auf  $3 \pm 2$  ppb bei 10% FiO<sub>2</sub> (Abbildung 14). Der Abfall der eNO-Werte bei dieser Messung ist signifikant ( $p=0.0016$ ).

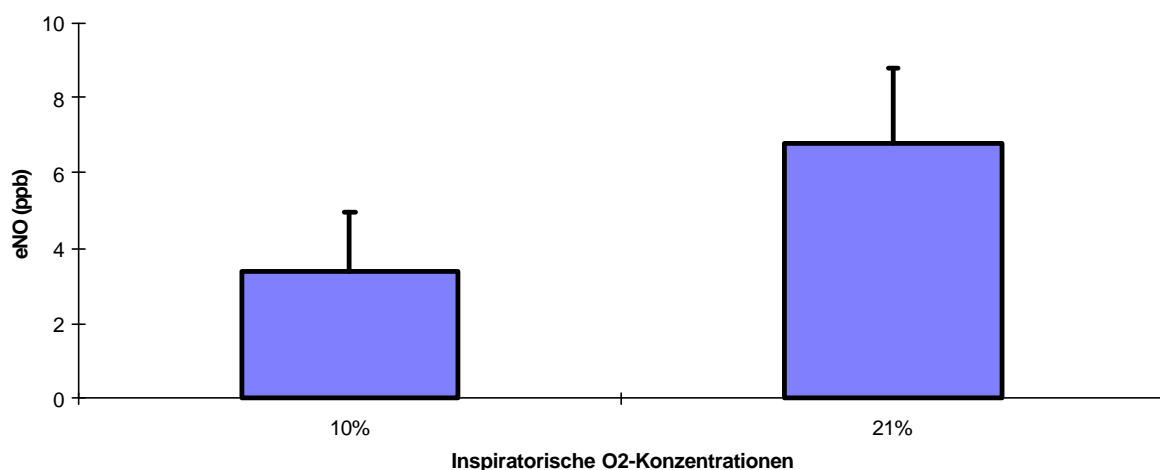


Abbildung 14: eNO-Werte mit einem FiO<sub>2</sub> von 10% und von 21% an Gruppe 6

### 3.7.2 Ergebnisse der Messungen an Gruppe 7

Um das Ergebnis der Erwachsenenmessung an Kindern zu bestätigen, wurden an der Kindergruppe 7 ebenfalls Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub> durchgeführt. Da die Messungen mit fünf FiO<sub>2</sub>-Werten für die Probanden sehr anstrengend sind, beschränkten wir uns bei den Kindern auf zwei unterschiedliche FiO<sub>2</sub>-Werte, 21% FiO<sub>2</sub> und 50% FiO<sub>2</sub>, da bei diesen Konzentrationen der größte Effekt zu verzeichnen war. Es ergab sich für die Messung bei 21% FiO<sub>2</sub> ein eNO-Wert von  $5 \pm 4$  ppb. Bei der Steigerung des FiO<sub>2</sub> auf 50% konnte eine mittlere Erhöhung der eNO-Werte um 3 ppb auf  $8 \pm 5$  ppb gemessen werden (Abbildung 15). Im Wilcoxon-Test zeigt sich, daß der Anstieg von eNO signifikant ist ( $p=0.0002$ ).

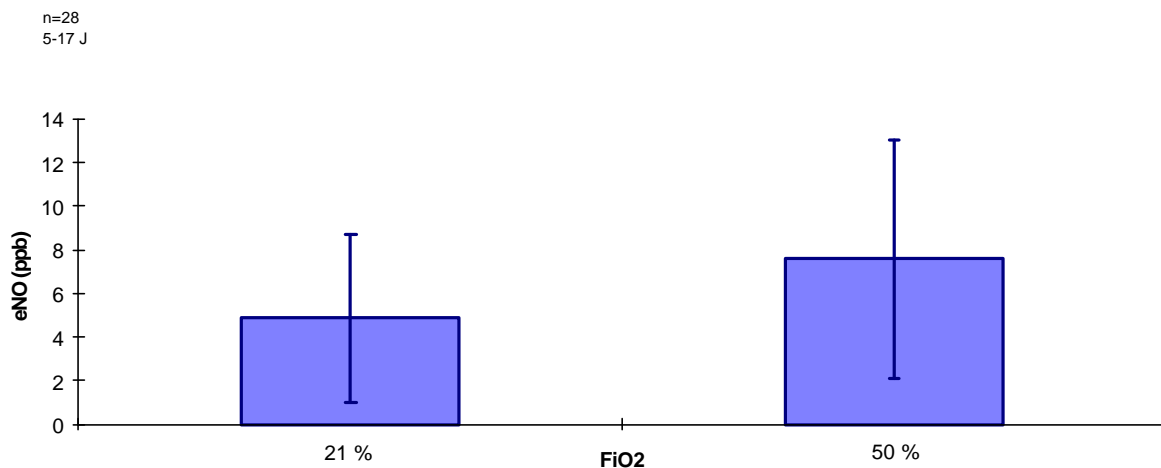


Abbildung 15: eNO-Werte der Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub> bei Kindern (Gruppe 7)

### 3.7.3 Ergebnisse der Messungen bei Breathholding

Im Rahmen der Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub> wurde versucht, durch ein Breathholding-Manöver die eNO-Konzentration noch weiter zu steigern. Das Luftanhalten stellt eine zusätzliche Belastung der Probanden dar, sodaß es nicht möglich war, diese Messungen mit allen Probanden durchzuführen. Wie bereits erwähnt, konnte das Breathholding nur mit 16 der 28 Kinder bei 21% FiO<sub>2</sub> und mit 10 dieser 16 Kinder erneut bei 50% FiO<sub>2</sub> durchgeführt werden. Stellt man die Ergebnisse der normalen Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub> denen der Breathholding-Manöver gegenüber, so findet sich bei 21% FiO<sub>2</sub> ein signifikanter eNO-Anstieg von  $6 \pm 4$  ppb auf  $13 \pm 9$  ppb ( $p=0.0006$ ; Abbildung 16).

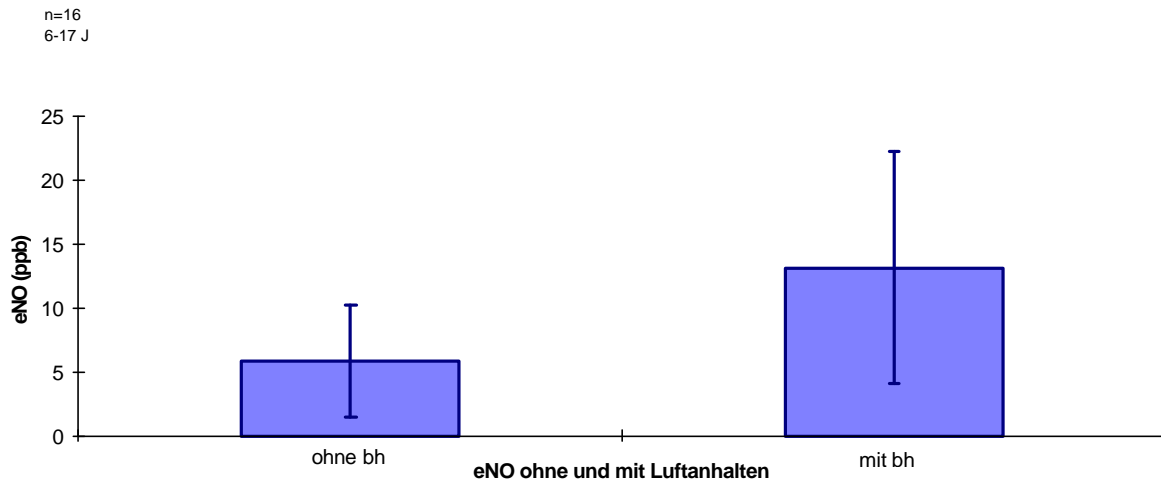


Abbildung 16: Messung von eNO bei Kindern während normaler Expiration und während Breathholding mit einem  $\text{FiO}_2$  von 21%.  
 ohne bh: eNO bei normaler Expiration  
 mit bh: eNO bei Expiration nach Luftanhalten

Bei den Messungen mit 50%  $\text{FiO}_2$  findet sich ein signifikanter eNO-Anstieg von  $8 \pm 7$  ppb bei normaler Expiration auf  $15 \pm 11$  ppb bei Expiration nach Luftanhalten ( $p=0.0076$ ; Abbildung 17). Zwischen den beiden Breathholding-Manövern mit den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen ist der eNO-Unterschied gering. Der Breathholding-Effekt kann also durch zusätzliche Erhöhung von  $\text{FiO}_2$  kaum weiter gesteigert werden.

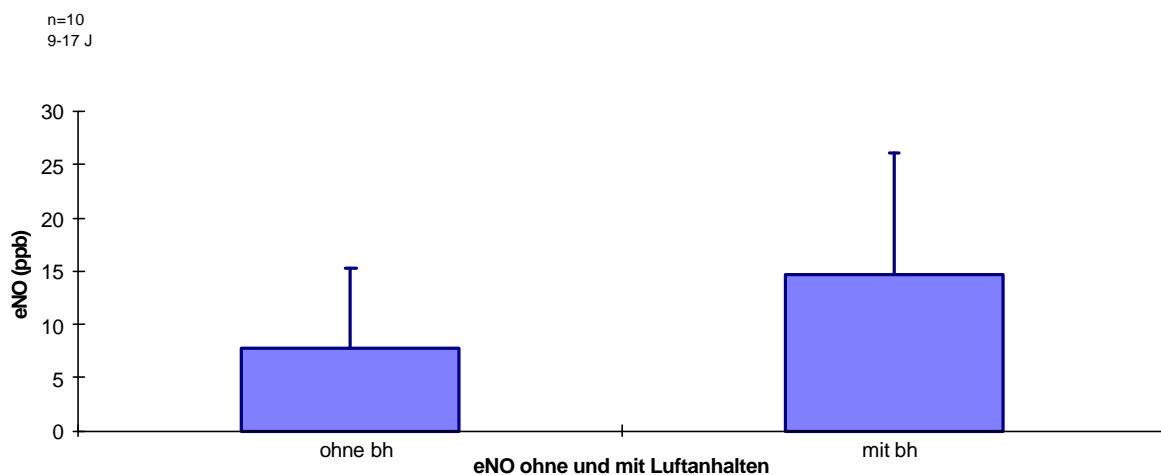


Abbildung 17: Messung von eNO bei Kindern während normaler Expiration und während Breathholding mit einem  $\text{FiO}_2$  von 50%  
 ohne bh: eNO bei normaler Expiration  
 mit bh: eNO bei Expiration nach Luftanhalten

### 3.8 Ergebnisse der Argininbelastungsmessungen

Neben Sauerstoff gehört auch L-Arginin zu den Substraten von NO. Nach den Ergebnissen der Messungen zum Einfluß von O<sub>2</sub> sollen nun die Ergebnisse der Argininbelastungsmessungen dargestellt werden. Diese Messungen wurden an Gruppe 8 durchgeführt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der Argininbelastungsmessungen

eNO	vor Arginingabe	Arginin- infusion	nach 2 Minuten	nach 30 Minuten	nach 60 Minuten	nach 90 Minuten	nach 120 Minuten
MW ± SD 21% FiO <sub>2</sub>	3 ± 2		9 ± 5	10 ± 5	9 ± 5	9 ± 4	9 ± 5
MW ± SD 50% FiO <sub>2</sub>	4 ± 3		10 ± 5	10 ± 5	9 ± 3	10 ± 4	9 ± 5

Die Messungen mit 21% FiO<sub>2</sub> ergeben einen eNO-Anstieg von 3 ± 2 ppb vor der L-Arginininfusion auf 9 ± 5 ppb 2 Minuten nach Ende der Arginininfusion. Bei den Messungen mit 50% FiO<sub>2</sub> erfolgt der Anstieg von 4 ± 3 ppb auf 10 ± 5 ppb. Die folgenden eNO-Werte bilden ein Plateau, das nach 120 Minuten einen leichten Abfall der eNO-Werte aufzeigt. Die Auswertung der Daten mit dem Wilcoxon-Test zeigt einen signifikanten Anstieg von eNO vor der Arginininfusion zu eNO nach der Arginininfusion, sowohl bei der Messung mit 21% FiO<sub>2</sub> (p=0.0178) als auch bei der Messung mit 50% FiO<sub>2</sub> (p=0.0178). Bei den 5 Messungen nach der Arginingabe findet sich keine signifikante Änderung der eNO-Werte (p=0.7180), sie bleiben annähernd gleich.

Die Kinder mußten sich im Anschluß an den Argininbelastungstest weiteren Untersuchungen unterziehen, so daß es nicht möglich war, die Messungen über die 120 Minuten hinaus fortzusetzen, um den zu erwartenden Abfall der eNO-Werte zurück zu den Ausgangswerten zu verfolgen (Abbildung 18).



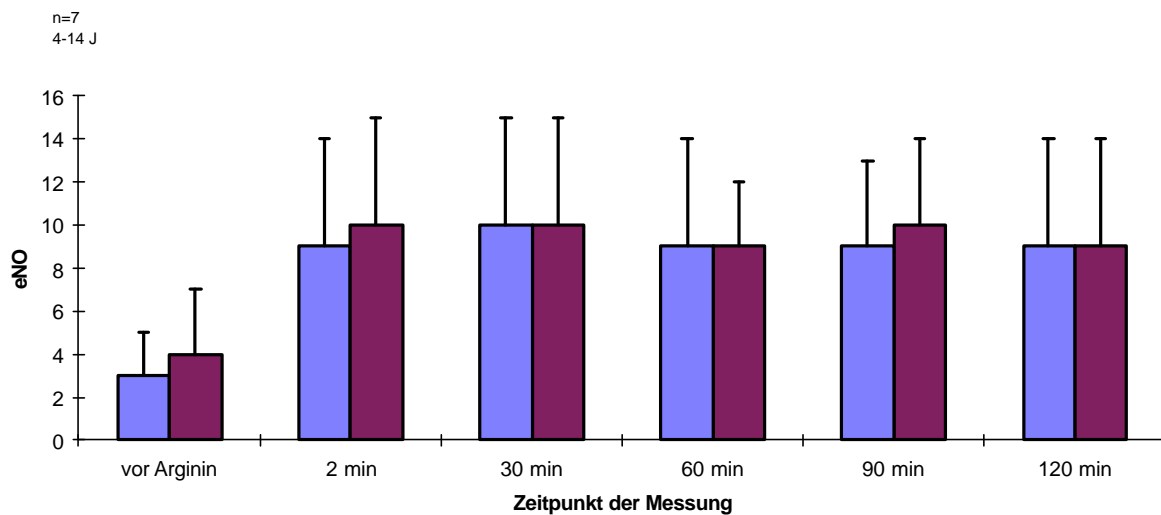


Abbildung 18: Ergebnisse der Messungen zum Einfluß von L-Arginin auf eNO  
helle Säulen: eNO bei 21% FiO<sub>2</sub>; dunkle Säulen: eNO bei 50% FiO<sub>2</sub>

### 3.9 Ergebnisse der Messungen an intubierten Probanden

Um den Nasen-Rachen-Raum als NO-Quelle auszuschalten, haben wir Messungen an den intubierten Probanden der Gruppen 9 und 10 durchgeführt.

An den intubierten Probanden der Gruppe 9 wurden eNO-Messungen mit zwei unterschiedlichen FiO<sub>2</sub>-Konzentrationen durchgeführt. Die eNO-Werte der Probanden lagen bei  $1 \pm 1$  ppb bei einem FiO<sub>2</sub> von 21%-31%. Die Sauerstoffsättigung der Probanden lag im Mittel bei 96%. Bei einer Erhöhung des FiO<sub>2</sub> auf 50%-100% lag eNO bei  $2 \pm 1$  ppb mit einer mittleren SO<sub>2</sub> von 99% (Abbildung 19). Mit dem Wilcoxon-Test läßt sich zeigen, daß der eNO-Anstieg signifikant ist ( $p=0.007$ ).

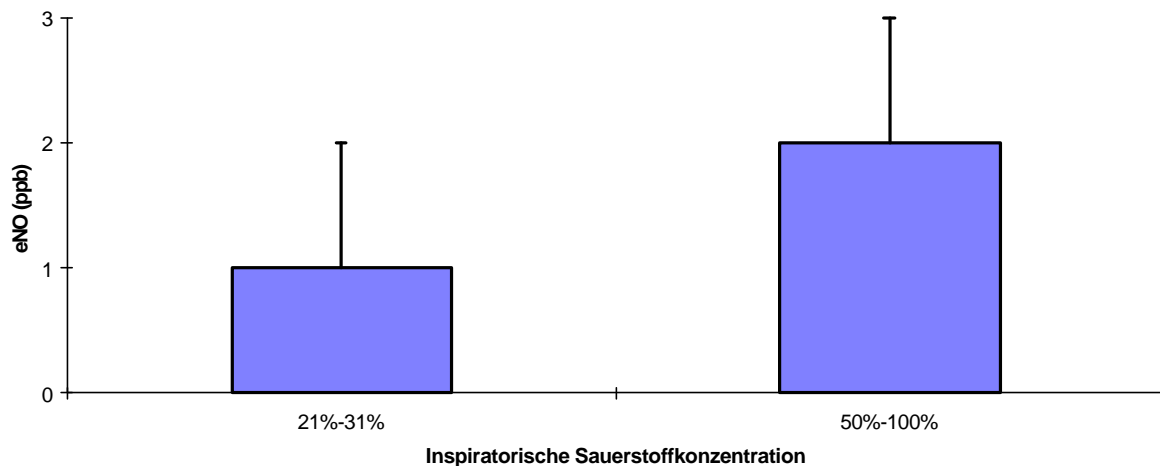


Abbildung 19: eNO-Messungen bei intubierten Kindern der Gruppe 9 mit zwei unterschiedlichen  $\text{FiO}_2$ -Konzentrationen

An Gruppe 10, den intubierten Erwachsenen, wurden identische Messungen durchgeführt. Bei dieser Probandengruppe lag eNO bei einem  $\text{FiO}_2$  von 21%-31% bei  $1 \pm 1$  ppb, die  $\text{SO}_2$  lag im Mittel bei 97%. Unter Erhöhung des  $\text{FiO}_2$  auf 50%-100% stieg die  $\text{SO}_2$  im Mittel auf 100% an. Der eNO-Wert der Probanden erhöhte sich signifikant auf  $3 \pm 1$  ppb ( $p=0.008$ ; Abbildung 20).

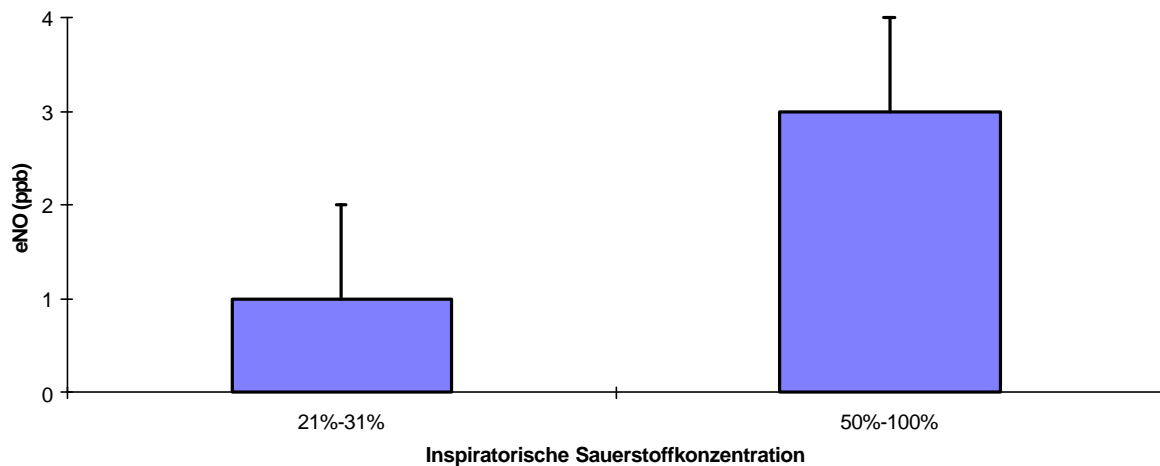


Abbildung 20: eNO-Messungen bei intubierten Erwachsenen der Gruppe 10 mit zwei unterschiedlichen  $\text{FiO}_2$ -Konzentrationen

Auch bei diesen Messungen ist ein geringer Sauerstoffeffekt nachzuvollziehen. Die eNO-Werte der nichtintubierten Probanden liegen deutlich höher, als die eNO-Werte der intubierten Probanden.

## 4. Diskussion

Die Bestimmung von NO in der Ausatemluft wurde bereits von Borland et al. im Jahre 1993 beschrieben. In dieser Studie wurde eine interindividuelle Variabilität der eNO-Werte gesunder Probanden zwischen 8 und 20 ppb festgestellt (Borland et al. 1993). Diese individuellen Schwankungen konnten von uns bestätigt werden. Es stellte sich die Frage, ob die NO-Freisetzung der unteren Atemwege meßbar ist. Weiterhin wollten wir wissen, ob sich die NO-Bildung in den Atemwegen durch Gabe der Substrate O<sub>2</sub> und L-Arginin beeinflussen läßt. Unsere Untersuchungen wurden durch einige Faktoren, welche die NO-Bildung und Freisetzung betreffen, beeinflußt. Die Ergebnisse und die Einflüsse sollen nun Gegenstand der Diskussion sein.

### ***4.1 Diskussion der Meßtechnik und des Meßaufbaus***

NO in den Atemwegen ist sowohl im Mund als auch in der Nase meßbar. Unsere Messungen zeigen, daß die Nasen-NO-Werte deutlich höher sind als die NO-Werte, die im Mund der Probanden gemessen wurden. Dieser Sachverhalt wurde in anderen Studien bestätigt (Lundberg et al. 1994a). Der Beitrag der Nase zum NO-Gehalt der Ausatemluft soll laut Schedin etwa 90% ausmachen (Schedin et al. 1995). Um Aussagen über die NO-Bildung der unteren Atemwege machen zu können, soll der Nasopharynx aus der Messung ausgeschaltet werden. Eine Möglichkeit dazu besteht in der Trennung von Oropharynx und Nasopharynx durch Verschließen des weichen Gaumens (Kimberly et al. 1996). Diese Methode erfordert die Mitarbeit des Probanden, denn sie muß geübt werden. Bei Kindern stellt die benötigte Kooperation einen limitierenden Faktor dar. Außerdem ist es schwierig, diese Methode in Situationen anzuwenden, in denen die zur Verfügung stehende Zeit begrenzt ist. Der Verschuß des Nasopharynx durch einen kleinen Ballonkatheter gestaltet sich ebenfalls als schwierig, das Plazieren dieses Katheters ist sehr unangenehm, zudem kommt es zur mechanischen Reizung der Nasenschleimhaut, was zur Beeinflussung der NO-Ausschüttung führen kann. Bei unseren Messungen trugen die Probanden Nasenklemmen, wie es bereits in anderen Studien gehandhabt wurde (Dötsch et al. 1996). Mittlerweile ist die Benutzung von Nasenklemmen umstritten, da es durch mechanische Schleimhautreizung und durch Anflutung von NO möglicherweise zu einem Verstärkungseffekt kommt (Rubinstein et al. 1995). Andere Arbeitsgruppen sind zu der Überzeugung gekommen, daß bei NO-Messungen in der oralen Atemluft keine Nasenklemmen verwendet werden sollen, um eine mögliche Beeinflussung zu unterbinden (Kharitonov et al.

1997). Da kleine Kinder aufgrund ihrer Anatomie, ohne Nasenklemme nicht ausschließlich durch den Mund atmen können, führten wir alle Messungen unter Benutzung einer Nasenklemme durch.

Bei unserem Meßaufbau wurde die inspiratorische Luft in Beuteln aufgefangen und über ein Schlauchsystem dem Probanden zugeführt. Die expiratorische Luft des Probanden wurde zunächst durch ein Y-Stück geleitet, dann wurde ein Teil der Luft über Meßschläuche der Meßgaskammer des Analysators zugeführt. Die von uns verwendeten Ballons und Schläuche waren aus PTFE, bzw. Teflon, welches weder NO absorbiert noch freisetzt. Wir führten regelmäßig Probenmessungen aus den Beuteln durch, um sicher zu sein, daß es auch nach Stunden nicht zur NO-Anreicherung in den Beuteln kommt.

Die Probleme, die es zu Beginn unserer Messungen mit dem Analysator gab, wurden durch kleine Änderungen behoben. Durch die Verkürzung der Meßwege konnte die Ansprechzeit des Analysators verbessert werden. Weiterhin wurde die Trocknung des Meßgases verbessert, denn in anderen Studien wurde gezeigt, daß Feuchtigkeit die NO-Werte vermindert im Vergleich zu trockener Luft (van der Mark et al. 1997). Die durchgeführten Änderungen, die in einem anderen Teil der Arbeit ausführlich geschildert werden (siehe Kapitel 2.3 Entwicklung der Meßtechnik), konnten das Gerät wesentlich verbessern. Zu den Punkten, die bisher noch nicht optimiert werden konnten, zählt die lange Warmlaufzeit des Analysators. Dadurch ist er in akuten Situationen kaum einsetzbar. Die Größe des Analysators ist unhandlich, die zur Messung benötigte Sauerstoffflasche für den Ozongenerator und die Vakuumpumpe sind aufgrund ihrer Größe nicht in den Aufbau des Analysators integriert, sie benötigen zusätzlichen Raum. Die häufigen Kalibrierungen erschweren zusätzlich den spontanen Einsatz des Gerätes.

Es gibt mittlerweile viele Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zur Bestimmung von oralem und nasalem NO mittels der Chemilumineszenzmethode. Die gemessenen Werte differieren teilweise stark, was ein Indiz dafür ist, daß nach wie vor große Unterschiede in den technischen und meßtechnischen Gegebenheiten vorliegen. Dadurch wird es erschwert, Werte unterschiedlicher Herkunft miteinander zu vergleichen (Kharitonov et al. 1997). Hinzu kommt die vorhandene physiologische Schwankungsbreite, die inter- und intraindividuell in gesunden Probanden deutlich wird. Sie erschwert den Vergleich von eNO-Werten unterschiedlicher Personen. Aufgrund dieser Feststellungen ist es notwendig, die Messungen und die Meßtechniken weiter zu standardisieren.

Der Einfluß der Körperhaltung auf eNO ist noch nicht völlig geklärt, darum wurden die Messungen der Probanden in aufrecht sitzender Position durchgeführt (Kharitonov et al. 1997).

Möglicherweise wird eNO auch durch die Atmung selbst beeinflusst. In anderen Studien wurde gezeigt, daß die Atemgeschwindigkeit und die Atemtiefe die eNO-Werte beeinflussen. Bei langer, langsamer Expiration finden sich höhere eNO-Werte als bei schneller Expiration (Sato et al. 1996). Silkoff konnte ebenfalls einen Einfluß des expiratorischen Luftflusses auf die eNO-Werte zeigen (Silkoff et al. 1997). Unsere Messungen wurden ohne die Bestimmungen der Atemminutenvolumina und der Luftflüsse der Probanden durchgeführt. Da die Luftflüsse durch im System befindliche Ventile begrenzt waren, sind sie bei allen Messungen konstant. Für zukünftige Untersuchungen muß überlegt werden, ob die Erfassung dieser Werte eine sinnvolle Ergänzung für die eNO-Messungen darstellt.

## **4.2 Einflußfaktoren der NO-Messung**

Wir haben für unsere Messungen Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt, um Faktoren und Krankheiten auszuschalten, für die bereits ein Einfluß der endogenen NO-Bildung und NO-Freisetzung nachgewiesen werden konnte.

### **4.2.1 Körperliche Anstrengung**

Bei körperlicher Belastung kommt es zu einer Steigerung von eNO (Bauer et al. 1994; Mills et al. 1996). NO scheint an der Kontrolle der Atemwegsreaktion auf körperliche Belastung beteiligt zu sein (Chirpaz-Oddou et al. 1997). Durch die Belastung kommt es zur Erhöhung des Blutflusses in der Lunge und damit zu vermehrtem Scherstreß, der dann zur vermehrten Bildung von NO führt (Persson et al. 1990). Aus diesem Grund wurden unsere Messungen in körperlicher Ruhe und in entspannter, sitzender Körperhaltung der Probanden durchgeführt, Bewegungen sollten weitgehend unterlassen werden. Bei den Messungen an Kindern wurde darauf geachtet, daß sie während der Messung möglichst ruhig saßen, ohne zu zappeln. Ob Zappeln schon als körperliche Aktivität gilt, durch die die NO-Produktion beeinflusst wird, ist unklar. Da jedoch Zappeln auch zu einer ständigen Änderung der Körperhaltung führt, entschieden wir, aus Gründen der Meßstandardisierung, daß diese Art der Bewegung ebenfalls vermieden werden soll.

#### **4.2.2 Krankheiten als Einflußfaktoren**

Für einige Krankheiten ist ein Einfluß auf die endogene NO-Bildung nachgewiesen. Probanden, die an diesen Krankheiten litten oder entsprechende Symptome aufwiesen, wurden von den Messungen ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurden auch Personen mit Infekten als Probanden nicht zugelassen. Es bleibt die Frage bestehen, ob es zu der eben beschriebenen körperlichen Reaktion kommen kann, noch bevor der Proband subjektive Beschwerden äußert. Mißt man eine Person im Verlauf von mehreren Tagen, so ist es möglich, Veränderungen in ihrem Gesundheitszustand zu überwachen. Bei Einzelmessungen ist es schwierig, diese möglichen Veränderungen nachzuvollziehen. Allergische Reaktionen im Sinne von allergischen Entzündungen könnten bei Asthmatikern zu Spätreaktionen mit nachweislich erhöhten NO-Werten führen (Kharitonov et al. 1995b). Aus diesem Grunde wurden Personen mit allergischen Beschwerden zum Zeitpunkt der Messung als Probanden ausgeschlossen. Auch hier bleibt die Frage bestehen, inwiefern das subjektive Befinden der Personen mit den körperlichen Zeichen übereinstimmt. Auch ist fraglich, ob es bereits einen eNO-Anstieg vor dem klinischen Beginn eines Infektes gibt. Da wir dazu keine konkreten Daten finden konnten, wurde bei Probanden mit Infekten und allergischen Reaktionen ein zeitlicher Spielraum eingehalten. Personen, die innerhalb der letzten vier Tage an Atemwegsinfekten litten, schlossen wir von den Messungen aus. Um Infekte sicher auszuschließen, müßten die Probanden auch nach den Messungen über einige Tage hinweg überwacht werden. Lungenfunktionstests und Laborparameter könnten zur Abklärung von Infekten beitragen. Da eine solche Überwachung nicht praktikabel ist, haben wir uns bei unseren Messungen auf die Anamneseerhebung beschränkt. Ein gewisses Restrisiko, Infekte zu übersehen, bleibt dadurch bestehen.

#### **4.2.3 Weitere Einflußfaktoren**

In der Einleitung zu dieser Untersuchung wurde bereits die intragastrische NO-Bildung beschrieben. Bei Ruktation eines Probanden während der NO-Messung kann es zu einer Kontaminierung der expiratorischen Luft mit NO aus dem Magen kommen. Um einer Verfälschung der eNO-Werte vorzubeugen, wurden Messungen mit solchen Vorfällen abgebrochen und nach einer Pause wiederholt. Dieses Vorgehen wird auch in anderen Studien empfohlen (Kharitonov et al. 1997).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der NO-Bildung sind sehr konträr, darum wurde dieser Punkt bei unseren Messungen nicht gesondert beachtet. Anamnestisch wurden keine Informationen zum Zyklus der Probandinnen erhoben. Viele der Kinder befanden sich in einem präpubertären Alter. Zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden im Kindesalter konnten keine Studien gefunden werden.

#### **4.3 Diskussion der unterschiedlichen Meßmethoden**

In einigen vorausgegangenen Studien wurde die ausgeatmete Luft der Probanden in Beuteln aufgefangen, anschließend wurde dann dieses Luftgemisch gemessen (Massaro et al. 1995). Bei unserem Vergleich zwischen Reservoir- und Direktmessungen zeigte die Auswertung nach Bland-Altman, daß die beiden Methoden nicht zu vergleichen sind. Dieses Ergebnis konnte bereits in einer anderen Studie bestätigt werden (Robbins et al. 1996). Wir entschieden uns dafür, unsere Untersuchungen mit der Direktmessung durchzuführen, da eine Darstellung von Atemluftkurven bei der Reservoirmessung nicht möglich ist. Die Darstellung der Atemkurven bei der Direktmessung bietet die Möglichkeit, die NO-Ausschüttung während der Atmung direkt zu überwachen. Bei Zwischenfällen wie Schlucken oder Aufstoßen während der Messung, die Einfluß auf die NO-Freisetzung haben können, lassen sich die Änderungen direkt an der Kurve nachvollziehen. Werteänderungen, plötzliche Peaks usw. können den entsprechenden Auslösern zugeordnet werden und die Messung kann gegebenenfalls abgebrochen werden. Bei der Reservoirmessung wird die NO-Freisetzung aller Atemphasen im Beutel gemischt. Wir führten Direktmessungen durch, denn uns interessierte die NO-Freisetzung der tieferen Atemwege.

Die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der eNO-Werte ist noch immer problematisch. Unsere Stabilitätsmessungen zeigen, daß die eNO-Werte eines Probanden innerhalb eines Tages stabil sind und daß es bei Messungen an unterschiedlichen Tagen etwas größere Abweichungen gibt. Dieses Ergebnis wird in einer anderen Studie bestätigt (Gabbay et al. 1998). Die Abweichungen an den unterschiedlichen Meßtagen sind vermutlich multifaktoriell verursacht. Es war uns jedoch trotz täglicher Anamnese hinsichtlich Veränderungen nicht möglich, spezifische Einflußfaktoren zu bestimmen. Aufgrund der großen Anzahl der NO-beeinflussenden Faktoren, die bei weitem noch nicht alle beschrieben sind, ist es schwierig, einzelne NO-Werte zu beurteilen. Es ist denkbar, die eNO-Werte als zusätzlichen Parameter bei der Registrierung individueller Veränderungen zu nutzen, z. B. bei der Erfolgskontrolle einer

Glukokortikoidtherapie bei Asthmatikern. Die eNO-Werte sind aufgrund der großen Schwankungsbreite nur im Zusammenhang mit anderen klinischen Parametern, wie z. B. Entzündungsparametern, Bronchialbiopsien, Sputumuntersuchungen interpretierbar (Kharitonov et al. 1997). Bei der langfristigen Überwachung von Patienten, z. B. von Asthmatikern unter Glukokortikoidtherapie, ist die eNO-Messung als sinnvolle Ergänzung der Diagnostik denkbar. Einzelne eNO-Werte hingegen liefern keine verwertbaren Informationen.

Der Unterschied zwischen den eNO-Werten der Probanden, die mit NO-haltiger Inspirationsluft gemessen wurden, zu denen, die mit NO-freier Inspirationsluft gemessen wurden, ist signifikant. Die Änderung der eNO-Werte ist individuell verschieden, so daß wir zur Standardisierung alle Messungen mit NO-freier Luft durchgeführt haben. Gerlach et al. fanden, daß es physiologisch zur Autoinhalation von NO aus dem Nasopharynx in die Lunge kommt (Gerlach et al. 1994). Fraglich bleibt dabei, was mit dem eingeatmeten NO passiert. Es wird vermutet, daß ein großer Teil des inhalierten NO von der Lunge aufgenommen wird, da NO schnell an Hämoglobin bindet (Borland et al. 1993; Sharma et al. 1987). Darauf basierend sind andere Studien zu dem Ergebnis gekommen, daß es keine Beziehung zwischen dem NO-Gehalt der Umgebungsluft und den eNO-Werten einer Person gibt (Massaro et al. 1996; Robbins et al. 1996). Trotz dieser unterschiedlichen Ergebnisse gehört die Inhalation NO-freier Luft während der eNO-Messungen zum weit verbreiteten Standard und wird allgemein befürwortet (Kharitonov et al. 1997). Offen bleibt, ob die ständige Inhalation von NO aus der Umgebungsluft einen langfristigen Einfluß auf die endogene NO-Bildung einer Person haben kann, der bei einer kurzen, einzelnen Messung nicht nachvollziehbar ist. Es ist denkbar, daß es bei NO-Einatmung zu einem negativen Feedback auf die endogene NO-Bildung durch NOS kommt. Die von uns standardisierte Voratemzeit von 10 Atemzügen vor jeder Messung soll NO aus der Lunge auswaschen und den Einfluß der Umgebungsluft vermindern. Durch diese ungeklärten Einflüsse bleibt es weiterhin schwierig, die eNO-Werte verschiedener Personen miteinander zu vergleichen, die möglicherweise unter verschiedenen Bedingungen gemessen wurden. Dadurch muß nach wie vor die weitere Standardisierung der Messungen im Vordergrund stehen.

Die Interpretation der NO-Werte gestaltet sich aufgrund des physiologischen Schwankungsbereichs schwierig. Wir konnten zeigen, daß auch gesunde Personen teilweise sehr geringe eNO-Werte aufweisen, in Einzelfällen findet sich sogar eine völlige Abwesenheit von NO in der Atemluft. Unsere Messungen zum Einfluß der Substrate der NOS auf die eNO-Bildung könnten der Abgrenzung und Unterscheidung einer passageren NO-Abwesenheit von



einer echten NO-Bildungsstörung aufgrund eines NOS-Mangels dienen. Die Ergebnisse unserer Messung zum Einfluß von  $O_2$  zeigen, daß sich bei Erhöhung des Substrats das Produkt NO steigern läßt.  $O_2$  wird zusammen mit L-Arginin bei Anwesenheit des Enzyms NOS zu NO umgesetzt. Kommt es nun bei Erhöhung des  $FiO_2$  zu einer Erhöhung der eNO-Werte, so kann man davon ausgehen, daß eine ausreichende Menge von NOS vorhanden ist. Dabei muß bedacht werden, daß unterschiedliche Formen der NOS im Körper vorkommen, die in verschiedensten Zellen zu finden ist. Eine genaue Aussage über die Herkunft des eNO kann nicht getroffen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß der größte Teil aus den Endothelzellen der Lungengefäße stammt, denn dort kann der inspirierte Sauerstoff direkt wirken. NO hat eine kurze Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden. Nach der Erhöhung von  $FiO_2$  kommt es unmittelbar zu einem meßbaren Anstieg von eNO. Dieser Sachverhalt spricht ebenfalls für die Herkunft des NO aus dem Gefäßendothel der Lunge.

Gustafsson et al. fanden, daß es bei einer Änderung von  $FiO_2$  zu einer Änderung der endogenen NO-Bildung und damit des Gefäßtonus kommt (Gustafsson et al. 1991). Dabei wurde auch beschrieben, daß es bei einer Hypoxie von 6%  $O_2$  in der Inspiration zu einer Erniedrigung der NO-Werte kommt. Unsere Hypoxiemessungen bestätigen bereits bei einem  $FiO_2$  von 10% dieses Ergebnis. Bei Verminderung des Substrats scheint auch das Produkt vermindert zu sein. Die Sauerstoffprovokation ist als nichtinvasive Methode für eNO-Messungen geeignet, um Informationen über das Vorhandensein der NOS zu bekommen.

Neben dem Sauerstoffeinfluß stellt das Luftanhalten eine weitere Stimulationsmöglichkeit dar. Durch ein solches Manöver wird die eNO-Freisetzung der Probanden zu Beginn der Expiration signifikant erhöht. In anderen Studien konnte eine Korrelation zwischen der Dauer des Breathholdings und der Höhe des NO-Peaks nachgewiesen werden, während der hintere Kurvenanteil, also das Plateau, weitgehend unverändert blieb (Persson et al. 1993; Kharitonov et al. 1996b). Während des Luftanhaltens wurden auch in der Nase stark erhöhte NO-Werte gemessen (Schedin et al. 1995). Die Ergebnisse dieser Studien geben Grund zur Annahme, daß das vermehrte NO nicht aus den tieferen Atemwegen stammt, sondern daß es sich dabei um Anflutungen aus dem Nasopharynx handelt. Bei Abstammung des vermehrten NO-Anteils aus dem alveolären Bereich wäre mit einer Erhöhung im hinteren Kurvenabschnitt zu rechnen.

NO wird in den Endothelzellen der Gefäße aus L-Arginin gebildet (Palmer et al. 1988a). Das Enzym NOS kann sowohl endogenes als auch exogenes Substrat zur NO-Bildung verwenden (Palmer et al. 1988b). Vallance et al. zeigten, daß nach Gabe von L-Arginin eine vermehrte Freisetzung von NO in den Blutgefäßen gemessen werden kann (Vallance et al. 1995). Wir fanden, daß nach intravenöser Gabe von L-Arginin eine signifikante Erhöhung von eNO in der Atemluft meßbar ist. Durch eine Substraterhöhung kann, bei ausreichend vorhandener NOS, eine Produkterhöhung erzielt werden. Durch die Gabe von L-Arginin ist es möglich, Aussagen über das Vorhandensein von NOS zu machen. Ein zusätzlicher Effekt durch die Erhöhung des  $\text{FiO}_2$  wurde bei dieser Messung nicht mehr erreicht, was mit einer Sättigung des Enzyms erklärt werden kann. Kharitonov et al. zeigten, daß die orale Gabe von L-Arginin zu einer Erhöhung von NO in der Atemluft führt (Kharitonov et al. 1995e). Dabei wurde ein Maximalwert nach zwei Stunden erreicht. Bei unseren Messungen wurde der Maximalwert bereits nach 30 Minuten erreicht, was vermutlich auf die schnellere Wirksamkeit des intravenös verabreichten Substrats zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse könnten therapeutische Relevanz bei Krankheiten haben, die mit einer verminderten Produktion von NO einhergehen. Die Steigerung von NO durch L-Arginin ist jedoch nur bei ausreichender Menge von NOS möglich, sodaß sich die therapeutische Relevanz nicht auf Krankheiten bezieht, die mit einem partiellen oder totalen NOS-Verlust einhergehen.

Die großen Standardabweichungen unserer Meßwerte erklären sich teilweise durch den großen physiologischen Schwankungsbereich der eNO-Werte bei Gesunden. Einen weiteren Grund kann die Störanfälligkeit der Messungen durch verschiedene Einflußfaktoren darstellen. Durch eine weitere Verbesserung und Optimierung der Messungen könnte dieses Problem möglicherweise vermindert werden.

Die Nase und der Nasen-Rachen-Raum stellen die größten NO-Quellen in den Atemwegen dar. Unsere Messungen an intubierten Probanden, bei denen der Nasen-Rachen-Raum als NO-Quelle ausgeschaltet war, zeigen deutlich niedrigere eNO-Werte als unsere Messungen an spontan atmenden Probanden. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Untersuchungen überein. Alving et al. fanden 1993, daß bei intubierten Probanden fast kein NO in der Atemluft meßbar ist (Alving et al. 1993). Gerlach et al. zeigten 1994, daß die NO-Konzentration in der Trachea nach Intubation absinkt (Gerlach et al. 1994). Ausgeatmetes NO scheint tatsächlich überwiegend aus Nase und Rachen zu stammen. Es bleibt nach wie vor ungeklärt, aus welchem Teil der unteren Atemwege das verbleibende NO stammt. Bei eNO-Messungen am externen Tubusende und bei Messungen am Tracheostoma bleiben Trachea und Bronchien nach wie vor

als NO-Quelle erhalten. Es bleibt ungeklärt, wie groß der alveoläre NO-Anteil ist. Dazu ist es nötig, mit den Meßgeräten in tiefste Lungenabschnitte vorzudringen. Trotzdem ist klar geworden, daß bei den eNO-Messungen der größte Teil des NOs nicht aus der Lunge selbst stammt. Der alveoläre NO-Anteil ist vermutlich sehr klein, so daß weitere Untersuchungen zur Herkunft von NO in der Lunge mit einem Gerät durchgeführt werden sollten, welches dazu in der Lage ist, NO im Bereich von 0.1 ppb zu messen. Die Genauigkeit unseres Analysators liegt im Bereich von  $\pm 1$  ppb. Es bleibt unklar, wie genau unser Gerät die minimalen NO-Konzentrationen erfassen kann, so daß die Interpretation der Werte unter dem Vorbehalt der Meßgenauigkeit erfolgen muß.

Vergleicht man nun die eNO-Werte der intubierten Probanden mit den eNO-Werten der nichtintubierten Probanden, so findet sich ein signifikanter Unterschied bei den Meßwerten dieser beiden Probandengruppen. Dieses Ergebnis unterstützt die Aussage, daß der größte Teil des endogen gebildeten NO nicht aus der Lunge, sondern aus den oberen Atemwegen stammt.

Die Messungen zum Einfluß der NOS-Substrate stellen eine Möglichkeit dar, Informationen über die NO-Bildung zu erhalten. Von Interesse ist dies bei Krankheiten, die mit einer verminderten NO-Bildung einhergehen. Bei Patienten mit primärer pulmonaler Hypertonie finden sich als Reaktion auf das reduzierte pulmonalkapilläre Blutvolumen niedrigere NO-Werte als bei Gesunden (Borland et al. 1994; Adel et al. 1995). Einige Studien zeigen, daß die Gabe von NO und L-Arginin den pulmonalarteriellen Druck in Patienten mit pulmonalem Hochdruck reduzieren können (Ivy et al. 1994; Higenbottam et al. 1993). Langzeitinhalationen von NO sind jedoch noch umstritten, da gezeigt werden konnte, daß es durch exogene NO-Gabe zu einer Herabregulation der körpereigenen NO-Produktion kommen kann, was beim Absetzen des inhalierten NO zu überschießendem pulmonalem Druckanstieg führen kann. Viele Herzfehler gehen ebenfalls mit pulmonaler Hypertonie einher, so daß auch hier die Möglichkeit der NO-Provokation in Diagnostik und Therapie interessant ist.

Es ist uns gelungen, Atemluftkurven zu erstellen. Die Kurven bestehen aus zwei Teilen, einem NO-Peak zu Beginn und einem anschließenden NO-Plateau, welches am Ende abfällt. Bei dem Peak am Anfang der Kurve scheint es sich um NO-Beimischungen aus dem Nasopharynx zu handeln, die sich in den oberen Atemwegen gesammelt haben und dann bei der Expiration zuerst ausgeatmet werden. Bei dem Plateau scheint es sich dann um NO aus den tieferen Atemwegen zu handeln. Dieses Ergebnis fanden wir in der Literatur bestätigt (Persson et al. 1993). In den tiefen Atemwegen ist der genaue Ursprung von NO noch unklar. Es wird jedoch vermutet, daß die NO-Bildung überwiegend proximal der Alveolen stattfindet. Nur ein kleiner

Teil scheint direkt auf alveolarer Ebene gebildet zu werden (Byrnes et al. 1997). Die eNO-Messungen in der Ausatemluft bei aktiven Probanden sowie diejenigen bei intubierten Patienten erfassen letztlich ein Luftgemisch, welches aus verschiedenen Regionen der Lunge stammt. Wie bereits erwähnt, steht die endogene NO-Bildung in engem Zusammenhang mit der Lungenperfusion und der Lungenventilation. Wenn man bei einer pulmonalen Durchblutungsverbesserung ansteigende eNO-Werte messen könnte, so könnte man davon ausgehen, daß dieser NO-Anteil aus den Alveolen stammt, da das pulmonale Gefäßnetz in direktem Kontakt mit den Alveolen steht. Es ist möglich, daß die endogene NO-Bildung in den Lungenabschnitten regional unterschiedlich verteilt ist. Solche regionalen Unterschiede können bei den üblichen eNO-Messungen nicht erfasst werden.

## 5. Schlußfolgerungen

NO ist in der Atemluft meßbar. Die Normwerte von gesunden Probanden haben jedoch eine große Schwankungsbreite. Dafür wird unter anderem die multifaktorielle Beeinflussung der NO-Bildung im Körper verantwortlich gemacht. Durch die Schwankungsbreite ist es schwierig, die eNO-Werte verschiedener Personen miteinander zu vergleichen.

Es ist uns gelungen, eNO-Atemluftkurven zu erstellen. Für die Weiterentwicklung dieser Kurven im Bereich niedriger eNO-Werte und kleiner Atemvolumina, wie es bei Kindern der Fall ist, ist die Fortführung der Untersuchung mit einem empfindlicheren Gerät sinnvoll.

Die Bildung und die Freisetzung von endogenem NO kann durch die Substrate O<sub>2</sub> und L-Arginin der NOS signifikant beeinflußt werden. Durch diese Stimulation können möglicherweise Aussagen über die NOS-Aktivität gemacht werden. Bei Krankheiten mit veränderter NOS-Aktivität, wie z.B. bei Asthma, kann die eNO-Messung nach Stimulation möglicherweise in der Diagnostik und in der Therapieüberwachung klinisch zur Anwendung kommen. Einzelne eNO-Werte sind schwer zu interpretieren.

Uns interessierte besonders die NO-Bildung in den tieferen Atemwegen, den Bronchiolen und den Alveolen. Der größte Teil des endogenen NO wird vermutlich in den oberen Atemwegen gebildet. Der NO-Anteil der tieferen Atemwege ist wahrscheinlich sehr gering (im Bereich von 0-3 ppb), sodaß er nur mit sehr empfindlichen Geräten differenziert zu erfassen ist. Für weiterführende Untersuchungen ist der von uns verwendete Analysator aufgrund seines Meßbereichs nicht optimal geeignet. Ein Meßgerät, welches dazu in der Lage ist im Bereich von 0.1 ppb zu messen, könnte die Aussagekraft verbessern.

## 6. Zusammenfassung

Zielsetzungen: Beeinflussung der endogenen NO-Bildung durch die Substrate der NOS und durch NO selbst. Entwicklung von NO-Atemkurven und von Meßmethoden für die eNO-Bestimmung in der Atemluft, um die Etablierung der NO-Messung in Diagnostik und Therapieüberwachung weiterzuentwickeln. Weiterentwicklung der NO-Meßtechnik, so daß Atemluftkurven online abgeleitet werden können und damit eine bessere örtliche Zuordnung ermöglicht wird.

Probanden: An Gruppe 1 wurden Untersuchungen zum Meßgasvolumenstrom durchgeführt. An Gruppe 2 machten wir Nasenmessungen. Vergleichsmessungen zwischen eNO-Reservoir und eNO-Atemluftkurve wurden an Gruppe 3 durchgeführt. Mit Gruppe 4 wurden Messungen zur Stabilität von eNO durchgeführt. Der Einfluß der Umgebungsluft auf eNO wurden an Gruppe 5 untersucht. In Gruppe 6 wurde der Effekt von Sauerstoff untersucht, ebenso in Gruppe 7. Die Argininbelastungsmessungen erfolgten an Gruppe 8. An den Gruppen 9 und 10 erfolgten Untersuchungen an intubierten Probanden.

Ergebnisse: Die Untersuchung zum Meßgasvolumenstrom an Gruppe 1 zeigten Werteabweichungen zwischen  $9 \pm 4$  ppb und  $11 \pm 4$  ppb bei Meßgasvolumenströmen zwischen 1000 ml/min und 500 ml/min.

Die Nasenmessungen an Gruppe 2 zeigten Nasen-NO-Mittelwerte von  $147 \pm 92$  ppb.

An Gruppe 3 wurden die Vergleichsmessungen von eNO-Reservoir und eNO-Atemluftkurve durchgeführt. Die MW der Atemluftkurve lagen um 4 ppb höher als die MW der Reservoirmessungen. Bei einer Korrelation von  $r^2=0,83$  zeigten die Werte nach Bland-Altman keine Übereinstimmung.

Die Messungen zur Stabilität von eNO wurden an Gruppe 4 durchgeführt. An fünf aufeinanderfolgenden Tagen zeigten die Mittelwerte der Probanden VK zwischen 0,13-0,57 bei 21% FiO<sub>2</sub>, bei 50% FiO<sub>2</sub> lagen die VK zwischen 0,14-0,65. Es fanden sich große Schwankungen bei diesen Werten. Bei den fünf aufeinanderfolgenden Messungen an einem Tag zeigten die Probanden bei 21% FiO<sub>2</sub> VK von 0-0,13. Bei 50% FiO<sub>2</sub> lagen die VK zwischen 0,05-0,2. Die Abweichungen dieser Werte waren sehr gering, eNO war relativ stabil.

An Gruppe 5 wurden die Messungen zum Einfluß der Umgebungsluft auf eNO durchgeführt. Bei den Messungen mit Umgebungs-NO > 0 lag der MW mit  $13 \pm 4$  ppb höher, als bei den Messungen mit Umgebungs-NO = 0 (MW =  $9 \pm 5$  ppb). Die Werteabweichungen der Probanden erfolgten in alle Richtungen.

An Gruppe 6 wurden Messungen zum Einfluß von  $O_2$  mit fünf unterschiedlichen  $FiO_2$ -Konzentrationen durchgeführt. Es ergab sich ein Anstieg von  $3 \pm 2$  ppb bei 10%  $FiO_2$  auf  $7 \pm 2$  ppb bei 21%  $FiO_2$ . Bei einer Erhöhung auf 50%  $FiO_2$  stieg eNO auf  $12 \pm 5$  ppb an. Die NOS scheint durch  $O_2$  stimulierbar zu sein, eNO steigt signifikant an, oberhalb von 50 %  $FiO_2$  kommt es zur Sättigung. Bei Hypoxie fällt eNO ab.

An Gruppe 7 wurden Messungen zum Einfluß von  $O_2$  mit zwei  $FiO_2$ -Werten durchgeführt. Hier wurde ein Werteanstieg von  $5 \pm 4$  ppb bei 21%  $FiO_2$  auf  $8 \pm 5$  ppb bei 50%  $FiO_2$  gemessen. Bei einem Breathholding-Manöver konnte ebenfalls ein eNO-Anstieg erreicht werden.

Die Argininbelastungsmessungen erfolgten mit Gruppe 8. Es kam zu einem eNO-Anstieg von  $3 \pm 2$  ppb vor Arginingabe auf  $10 \pm 5$  ppb 30 Minuten nach Arginininfusion. Es folgte ein Werteplateau mit einem leichten Abfall von eNO auf  $9 \pm 5$  ppb nach 120 Minuten.

An den Gruppen 9 und 10 wurden eNO-Messungen an intubierten Probanden durchgeführt. Mit eNO-MW zwischen  $1 \pm 1$  ppb und  $3 \pm 1$  ppb lagen sie niedriger als die Werte bei nichtintubierten Probanden.

Schlußfolgerungen: Es wurde gezeigt, daß NO in der Atemluft meßbar ist und daß die Werte eines Atemzyklus als Kurve aufgezeigt werden können. Messungen mit einem empfindlicheren Meßgerät könnten die Kurven und ihre Aussagekraft weiter verbessern. Die Untersuchungen haben bestätigt, daß die Bildung und Freisetzung von NO stimulierbar ist. Dadurch scheint es möglich, Aussagen über die Anwesenheit von NOS zu machen. Die eNO-Messung könnte eine neue Möglichkeit in der Diagnostik und Therapieüberwachung von Krankheiten bieten, die mit veränderter NOS-Aktivität einhergehen. Der NO-Analysator konnte verbessert werden. Für die Fortführung der Untersuchungen sollte ein Gerät mit einer höheren Empfindlichkeit verwendet werden, um niedrige eNO-Werte besser erfassen zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

Abman SH, Kinsella JP. Inhaled nitric oxide therapy for pulmonary disease in pediatrics. *Curr Opin Pediatr* 1998; 10(3):236-242

Änggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-1206

Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amounts of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6:1368-1370

Bauer JA, Wald JA, Doran S, Soda D. Endogenous nitric oxide in expired air: effects of acute exercise in humans. *Life Sci* 1994; 55:1903-1909

Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* 1995; 346:1085-1087

Bohme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol* 1991; 199:379-381

Borland C, Cox Y, Higenbottam T. Measurement of exhaled nitric oxide in man. *Thorax* 1993; 48:1160-1162

Borland C, Cox Y, Higenbottam T. Pulmonary capillary blood volume is reduced in patients with severe unexplained pulmonary hypertension. *Thorax* 1994

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:682-685

Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TSK, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257:401-403

Byrnes CA, Dinarevic S, Busst C, Bush A, Shinebourne EA. Is nitric oxide in exhaled air produced at airway or alveolar level ?. *Eur Respir J* 1997;10:1021-1025



Calver H, Collier J, Vallance P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp Physiol* 1993; 78:303-326

Chen PY, Sanders PW. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Clin Invest* 1991; 88:1559-1567

Chirpaz-Oddou MF, Favre-Juvin A, Flore P, Eterradossi J, Delaire M, Grimbert F, Therminarias A. Nitric oxide response in exhaled air during an incremental exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1997; 82(4):1311-1318

Crawley DE, Liu SF, Evans TW, Barnes PJ. Inhibitory role of endothelium-derived relaxing factor in rat and human pulmonary arteries. *J Br Pharmacol* 1990; 101:166-170

Cremona G, Higenbottam T, Borland C, Mist B. Mixed expired nitric oxide in primary pulmonary hypertension in relation to lung diffusion capacity. *Q J Med* 1994; 87:547-551

Cremona G, Higenbottam TW, Mayoral V, Alexander G, Demoncheaux E, Borland C, Roe P, Jones GJ. Elevated exhaled nitric oxide in patients with hepatopulmonary syndrome. *Eur Respir J* 1995; 8:1883-1885

Demirakca S. Therapeutische Strategien für die Stickstoffmonoxid(NO)-Inhalation in der pädiatrischen Intensivmedizin. Dissertation 1997, JLU Giessen.

Desai KM, Sessa WC, Vane JR. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 1991; 351:477-479

Dinh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, Wallwork J. Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1539-1547

Dötsch J, Demirakca S, Terbrack HG, Hüls G, Rascher W, Kühl PG. Airway nitric oxide in asthmatic children and patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 1996; 9:2537-2540

Förstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F. Isoforms of nitric oxide synthase, characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 1991; 42(10):1849-1857

Fontijn A, Sabadell AJ, Ronco RJ. Homogeneous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. *Analytical Chemistry* 1970; 42(6):575-579

Frostell CG, Fratacci MD, Wain JC, Zapol WM. Inhaled nitric oxide: a selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83:2038-2047

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376

Gabbay E, Fisher AJ, Small T, Leonard AJ, Corris PA. Exhaled single-breath nitric oxide measurements are reproducible, repeatable and reflect levels of nitric oxide found in the lower airways. *Eur Respir J* 1998; 11:467-472

Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RMJ, Moncada S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine or N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methylester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 1990; 101:10-12

Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-1777

Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, Stamler JS. The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:538-551

Gerlach H, Rossaint R, Pappert D, Knorr M, Falke KJ. Autoinhalation of nitric oxide after endogenous synthesis in nasopharynx. *Lancet* 1994; 343:518-519

Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333:214-221

Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181:852-857

Hamid Q, Springall DR, Riveros-Moreno V, Chanez P, Howarth P, Redington A, Bousquet J, Godard P, Holgate S, Polak JM. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet* 1993; 342:1510-1513

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide, a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157:87-94

Higenbottam T, Cremona G. Acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1993; 6:1207-1212

Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1992; 211:177-182

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. EDRF produced and released from artery and vein is NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;92:65-9269

Ivy DD, Wiggins JW, Badesch DB, Kinsella JP, Kelminson LL, Abman SH. Nitric oxide and prostacyclin treatment of an infant with primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol* 1994; 74:414-416

Jilma B, Kastner J, Mensik C, Vondrovec B, Hildebrandt J, Krejcy K, Wagner OF, Eichler HG. Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci* 1996; 58(6):469-476

Jorens PG, Van Overveld FJ, Bult H, Vermeire PA, Herman AG. L-arginine-dependent production of nitrogen oxides by rat pulmonary macrophages. *Eur J Pharmacol* 1991; 200: 205-209

Jorens PG, Vermeire PA, Herman AG. L-arginine dependent nitric oxide synthase: a new metabolic pathway in the lung and airways. *Eur Respir J* 1993; 6:258-266

Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154(1):236-244

Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr, Higgs EA. The biology of nitric oxide. *London: Portland Press* 1992; 1:319-322

Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994a; 343:133-135

Kharitonov SA, Logan-Sinclair R, Busset CM, Shinebourne EA. Peak expiratory nitric oxide differences in men and women: relation to the menstrual cycle. *Br Heart J* 1994b; 72:243-245

Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* 1995a; 8:295-297

Kharitonov SA, O'Connor B, Evans DJ, Barnes PJ. Allergen-induced late asthmatic reactions are associated with elevation of exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995b; 151:1894-1899

Kharitonov SA, Wells AU, O'Connor BJ, Cole PJ, Hansell DM, Logan-Sinclair R, Barnes PJ. Elevated levels of exhaled nitric oxide in bronchiectasis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995c; 151:1889-1893

Kharitonov SA, Robbins RA, Yates D, Keatings V, Barnes PJ. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995d; 152:609-612

Kharitonov SA, Lubec G, Lubec B, Hjelm M, Barnes PJ. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin Sci Colch* 1995e; 88(2):135-139

Kharitonov SA, Yates DH, Chung KF, Barnes PJ. Changes in the dose of inhaled steroid affect exhaled nitric oxide levels in asthmatic patients. *Eur Respir J* 1996a; 9:196-201

Kharitonov SA, Chung KF, Evans DJ, O'Connor BJ, Barnes PJ. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1996b; 153:1773-1780

Kharitonov SA, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal measurements: recommendations. *Eur Respir J* 1997; 10:1683-1693

Kimberly B, Nejadnik B, Giraud GD, Holden WE. Nasal contribution to exhaled nitric oxide at rest and during breathholding in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:829-836

Lampert LE, Whitten JP, Baron BM, Cheng HC, Doherty NS, McDonald IA. Nitric oxide synthesis in the CNS, endothelium and macrophages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci* 1991; 48:69-75

Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986; 8:Suppl II:61-66

Lundberg JO, Weitzberg E, Nordvall SL, Kuylensstierna R, Lundberg JM, Alving K. Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome. *Eur Respir J* 1994a; 7:1501-1504

Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994b; 35(11):1543-1546

Luscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension* 1987; 9:157-163

Malinski T, Mesaros S, Tomboulis P. Nitric oxide measurement using electrochemical methods. *Methods Enzymol* 1996; 268:58-69

Massaro AF, Gaston B, Kita D, Fanta C, Stamler JS, Drazen JM. Expired nitric oxide levels during treatment of acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:800-803

Massaro AF, Mehta S, Lilly CM, Kobzik L, Reilly JJ, Drazen JM. Elevated nitric oxide concentrations in isolated lower airway gas of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1510-1514

Miller OI, Tang SF, Keech A, Celermajer DS. Rebound pulmonary hypertension on withdrawal from inhaled nitric oxide. *Lancet* 1995; 346:51-52

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38(11): 1709-1715

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329(27): 2002-2012

Morris NH, Sooranna SR, Steer PJ, Warren JB. The effect of the menstrual cycle on exhaled nitric oxide and urinary nitrate concentration. *Eur J Clin Inv* 1996; 26:481-484

Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:65-70

Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6:3051-64

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988a; 333:664-666

Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988b; 153(3):1251-1256

Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158(1): 348-352

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; 323:22-27

Pepke-Zabe J, Higenbottam TW, Dinh-Zuan AT, Stone D, Wallwork J. Inhaled nitric oxide causes selective pulmonary vasodilation in patients with pulmonary hypertension. *Lancet* 1991; 338:1173-1174

Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P. Endogenous nitric oxide as probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol Scand* 1990; 140:449-459

Persson MG, Wiklund NP, Gustafsson LE. Endogenous nitric oxide in single exhalations and the change during exercise. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1210-1214

Persson MG, Zetterström O, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE. Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343:146-147

Pfizer Labs. Viagra®. 1998

Prehn H. Photoakustische Spektroskopie. *GIT* 1979; 23(4):281-289

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1987; 92:639-646

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3375-3378

Robbins RA, Floreani AA, von Essen SG, Sisson JH, Hill ME, Rubinstein I, Townley RG. Measurement of exhaled nitric oxide by three different techniques. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1631-1635

Rubinstein I, McClean PA, Boucher R, Zamel N, Fredberg JJ, Hoffstein V. Effect of mouthpiece, noseclips and head position on airway area measured by acoustic reflections. *J Appl Physiol* 1995; 63:1469-1474

Sato K, Sakamaki T, Sumino H, Sakamoto H, Hoshino J, Masuda H, Sawada Y, Mochida M, Ohyama Y, Kurashina T, Nakamura T. Rate of nitric oxide release in the lung and factors influencing the concentration of exhaled nitric oxide. *Am J Physiol* 1996; 270:L914-L920

Schächinger V, Zeiher AM. NO in der Therapie der Angina pectoris: Nitrate oder Molsidomin?. *Internist* 1997;38:438-447

Schedin U, Frostell C, Persson MG, Jakobsson J, Andersson G, Gustafsson LE. Contribution from upper and lower airways to exhaled endogenous nitric oxide in humans. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39:327-332

Schmidt HHW, Warner TD, Ishii K, Sheng H, Murad F. Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* 1992; 255:721-723

Schuman EM, Madison DV. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991; 254:1503-1506

Sharma VS, Taylor TG, Gardiner R. Reaktion of nitric oxide with haem proteins and model compounds of haemoglobin. *Biochem* 1987; 26:3837-3843

Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, Furlott HG, Hoffstein E, Wakita S, Chapman KR, Szalai JP, Zamel N. Marked flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:260-267



Sprague R, Thiemermann C, Vane JR. Endogenous endothelium-derived relaxing factor opposes hypoxic pulmonary vasoconstriction and supports blood flow to hypoxic alveoli in anaesthetised rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:8711-8715

Su Y, Couch M, Block ER. Substrate inhibition of nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells in culture. *Nitric Oxide* 1997; 1(6):469-475

Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989; 2(8670):987-1000

Vallance P, Patton s, Bhagat K, MacAllister R, Radomski M, Moncada S, Malinski T. Direct measurement of nitric oxide in human beings. *Lancet* 1995; 346:153-154

Van der Mark TW, Kort E, Meijer RJ, Postma DS, Koeter GH. Water vapour and carbon dioxide decrease nitric oxide readings. *Eur Respir J* 1997; 10:2120-2123

Wright CL, Rees DD, Moncada S. Protective and pathophysiological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res* 1992; 26:48-57

Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:892-896

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

AF	Atemfrequenz
AMV	Atemminutenvolumen
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ASD	Atrium-Septum-Defekt
AZV	Atemzugvolumen
BNS-Krämpfe	Blitz-Nick-Salaam-Krämpfe
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	Konstitutive Stickstoffmonoxid-Synthase
EDRF	Endothel derived relaxing factor
eNO	Expiratorisches Stickstoffmonoxid
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
GTP	Guanosintriphosphat
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
L-NAME	L-N <sup>G</sup> -Arginin-Methylester
L-NMMA	L-N <sup>G</sup> -Monomethyl-Arginin
MI	Mitralinsuffizienz
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>3</sub>	Ozon
ppb	Parts per billion
PS	Pulmonalstenose
PTFC	Polytetrafluorethylen
SO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
TI	Trikuspidalinsuffizienz
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VSD	Ventrikel-Septum-Defekt

## **8.2 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name:	Herzog
Vorname:	Nadine
Geburtsdatum/-ort:	04.02.1972 im Kassel
Anschrift:	Kärnergasse 2 97070 Würzburg
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Herzog, Dieter, Kaufmann Herzog, Edeltrud, geb. Bächt, Industriekauffrau

### **Ausbildungsdaten:**

1978-1982:	Grundschule in Wabern
1982-1991:	Gymnasium in Fritzlar, Abschluß: Abitur
1992-1999:	Studium der Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen Abschluß: Staatsexamen
Aug.-Sept. 1997:	Auslandsfamulatur, Chris Hani Baragwanath Hospital Johannesburg, Südafrika
1998-1999:	Praktisches Jahr JLU Gießen; Inselspital Bern, Schweiz

### **Bisherige Tätigkeiten:**

1991-1992:	Freiwilliges Soziales Jahr Städtische Kliniken, Kassel
seit 15.02.2000:	Ärztin im Praktikum Universitätskinderklinik Würzburg

### **8.3 Danksagung**

Prof. Dr. Peter Gonne Kühl möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die gute Betreuung während der Fertigstellung der Arbeit danken.

Für die ausgezeichnete Betreuung und die fördernden Diskussionen während der Ausführung und der Fertigstellung der Arbeit danke ich Dr. Süha Demirakça.

Traute Demirakça danke ich für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Mein Dank für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung während des praktischen Teils meiner Arbeit gilt den Mitarbeitern der Lungenfunktion der Kinderklinik, besonders Heike Hinkelthein, Monika Johnson und Holger Keller.

Ein besonderer Dank gehört meinen Eltern, die mich während der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation finanziell und moralisch unterstützt haben.

Meinem Freund Andreas danke ich herzlich für die technische und moralische Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.